

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
16. August 2001 (16.08.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/58932 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: C07K 9/00, C07H 15/203, A61K 31/70, C07D 491/22, A61K 38/14
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/00793
- (22) Internationales Anmeldedatum: 25. Januar 2001 (25.01.2001)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität: 100 05 275.4 7. Februar 2000 (07.02.2000) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): BAYER AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; 51368 Leverkusen (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): LERCHEN, Hans-Georg [DE/DE]; Sürderstr. 3, 51375 Leverkusen (DE). BAUMGARTEN, Jörg [DE/DE]; Henselweg 13, 42115 Wuppertal (DE).
- (74) Gemeinsamer Vertreter: BAYER AKTIENGESELLSCHAFT; 51368 Leverkusen (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
— vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: CYTOSTATIC AGENT GLYCOCONJUGATE

(54) Bezeichnung: GLYCOKONJUGATE VON CYTOSTATIKA

(57) **Abstract:** The invention concerns cytostatic agents which are more tumor-specific as a result of modification with carbohydrates. Urea or dicarboxylic acid units as appropriate spacers ensure serum stability and simultaneous intracellular effect. The compounds according to the invention have formula (I): K - Sp- L - AA1 - AA2 - C, wherein K represents an unsubstituted or regioselectively modified carbohydrate radical; Sp represents an optionally substituted arylene or alkylene; L represents a group of formula (a); AA1 represents a direct bond or an amino acid radical in the D or L configuration, optionally having protective groups or a second K-Sp-L grouping, in which K, Sp, L are independent from the other K-Sp-L grouping and may have the meaning cited above; AA2 represents a direct bond or an amino acid radical in the D or L configuration, optionally having protective groups or a second K-Sp-L grouping, in which K, Sp, L are independent from the other K-Sp-L grouping and may have the meaning cited above and C represents a cytostatic radical or the radical of a cytostatic agent or cytostatic agent derivative additionally having a hydroxy or amino group.

WO 01/58932 A1

(57) **Zusammenfassung:** Die vorliegende Erfindung betrifft Cytostatika, die durch Modifikation mit Kohlenhydraten tumorspezifischer sind. Harnstoff- oder Dicarbonsäureeinheiten als geeignete Spacer gewährleisten die Serumstabilität und gleichzeitig intrazelluläre Wirkung. Die erfindungsgemäßen Verbindungen besitzen die Formel (I): K - Sp- L - AA1 - AA2 - C, worin K ein unsubstituierter oder regioselektiv modifizierter Kohlenhydratrest, Sp ein gegebenenfalls substituiertes Arylen oder Alkylen, L eine Gruppe der Formel (a), AA1 eine direkte Bindung oder ein Aminosäure-Rest in der D- oder L-Konfiguration, der gegebenenfalls Schutzgruppen oder eine zweite Gruppierung K-Sp-L- trägt, in der K, Sp, L unabhängig von der anderen Gruppierung K-Sp-L- die oben angegebenen Bedeutungen haben können, AA2 eine direkte Bindung oder ein Aminosäure-Rest in der D- oder L-Konfiguration, der gegebenenfalls Schutzgruppen oder eine zweite Gruppierung K-Sp-L- trägt, in der K, Sp, L unabhängig von der anderen Gruppierung K-Sp-L- die oben angegebenen Bedeutungen haben können, und C ein cytotoxischer Rest oder der Rest eines Cytostatikums oder Cytostatikumderivats, der zusätzlich eine Hydroxy- oder Aminogruppe tragen kann, bedeutet.

GLYCOKONJUGATE VON CYTOSTATIKA

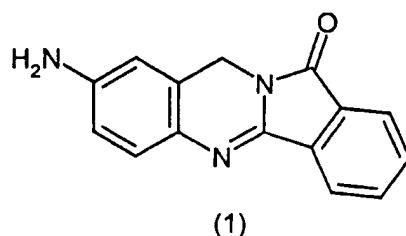
Die vorliegende Erfindung betrifft Cytostatika, die durch Modifikation mit Kohlenhydraten tumorspezifisch sind. Harnstoff- oder Dicarbonsäureeinheiten als geeignete 5 Spacer gewährleisten die Serumstabilität und gleichzeitig intrazelluläre Wirkung.

Die Chemotherapie bei Tumorerkrankungen ist begleitet von meist schwerwiegenden Nebenwirkungen, welche auf die toxische Wirkung von Chemotherapeutika auf 10 proliferierende Zellen anderer Gewebearten als Tumorgewebe zurückzuführen sind. Seit vielen Jahren beschäftigen sich Wissenschaftler mit dem Problem der Verbesserung der Selektivität von eingesetzten Wirkstoffen. Ein vielfach verfolgter Ansatz 15 ist die Synthese von Prodrugs, die mehr oder weniger selektiv im Zielgewebe beispielsweise durch Veränderung des pH-Wertes (Tietze et al., z.B. DE-A-4 229 903), durch Enzyme (z.B. Glucuronidasen; Jacquesy et al., EP-A-0 511 917; Bosslet et al., EP-A-0 595 133) oder durch Antikörper-Enzym-Konjugate (Bagshawe et al., WO 16 88/07378; Senter et al., US-4 975 278; Bosslet et al., EP-A-0 595 133) freigesetzt werden. Problematisch bei diesen Ansätzen ist unter anderem die mangelnde Stabilität der Konjugate in anderen Geweben und Organen, und insbesondere die ubiquitäre Wirkstoffverteilung, die sich an die extrazelluläre Wirkstofffreisetzung im 20 Tumorgewebe anschließt.

Das ausgeprägte Lektinmuster auf Tumorzelloberflächen (Gabius; Onkologie 12, (1989), 175) eröffnet die prinzipielle Möglichkeit, durch Anknüpfen entsprechender Kohlenhydratbausteine an Cytostatika diese gezielt an Tumorzellen zu adressieren. 25 Eingeschränkt wird diese Perspektive dadurch, daß auch in anderen Geweben, insbesondere in der Leber, Lektine mit ähnlichen Kohlenhydratspezifitäten (Galactose, Lactose, Mannose, N-Acetyl-glucosamin, Fucose etc.) vorkommen (Ashwell et al., Annu.Rev.Biochem. 46 (1982), 531; Stahl et al. Proc.Natl.Acad.Sci. USA 74 (1977), 1521; Hill et al., J.Biol.Chem. 262 (1986), 7433; Jansen et al., J.Biol.Chem. 266 30 (1991), 3343). Demzufolge muß mit einer deutlichen Anreicherung von wirkstoffhaltigen Glycokonjugaten in der Leber und anderen lektinreichen Organen

gerechnet werden, wenn bei diesem Ansatz Kohlenhydrate ohne besondere, eine Selektivität gegenüber Tumorgewebe begründende Modifizierung verwendet werden.

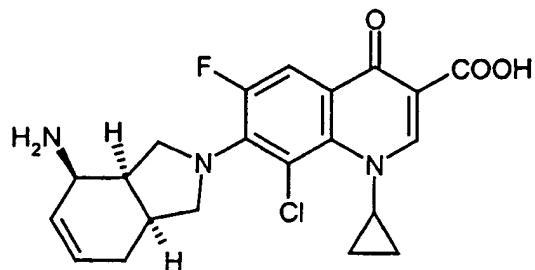
Das heterocyclische Amin Batracylin (1) zeigt in verschiedenen Darmkrebs-
5 Modellen eine gute Antitumorwirkung (US-4 757 072).



Peptidkonjugate von (1) mit guter In-vitro-Wirkung und günstigeren Löslichkeits-eigenschaften (US-4 180 343) sind im Tierversuch schlechter verträglich als freies Batracylin. Die in EP-A-0 501 250 beschriebenen Fucose-Konjugate von Batracyclin (1) reichern sich nachteiligerweise sehr stark in der Leber an.

15 Das Chinolon-a (2) 7-[(3a-R,S, 4-R,S, 7a-S,R)-4-Amino-1,3,3a,4,7,7a-hexahydro-
iso-indol-2-yl]-8-chlor-1-cyclopropyl-6-fluor-1,4-dihydro-4-oxo-3-chinolincarbon-
säure zeigt neben seiner hervorragenden antibakteriellen Aktivität auch eine sehr gute
Wirksamkeit gegenüber verschiedenen Tumorzelllinien (EP-A-0 520 240, JP-4 253
973). Dem stehen jedoch erhebliche toxikologische Probleme gegenüber (z.B. Geno-
toxizität, Knochenmarks-Toxizität, hohe akute Toxizität in vivo etc.).

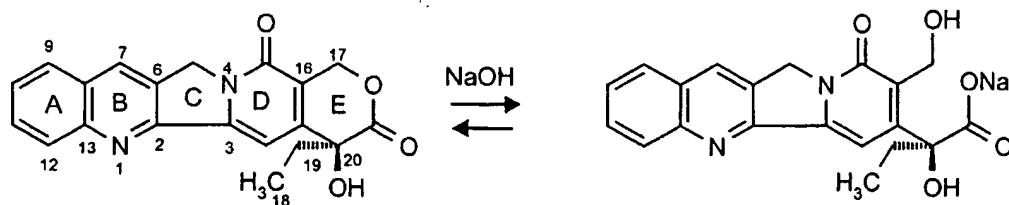
20



(2) (Chinolon-a)

20(S)-Camptothecin ist ein pentacyclisches Alkaloid, das 1966 von Wall et al. isoliert wurde (J.Am.Chem.Soc. 88, 3888 (1966)). Es besitzt ein hohes Antitumor-Wirkpotential in zahlreichen In-vitro- und In-vivo-Tests. Leider scheiterte jedoch die 5 Realisierung des vielversprechenden Potentials in der klinischen Untersuchungsphase an Toxizitäts- und Löslichkeitsproblemen.

Durch Öffnung des E-Ring-Lactons und Bildung des Natriumsalzes wurde eine 10 wasserlösliche Verbindung erhalten, die in einem pH-abhängigen Gleichgewicht mit der ringgeschlossenen Form steht. Klinische Studien führten auch hier bisher nicht zum Erfolg.



15 Etwa 20 Jahre später wurde gefunden, daß die biologische Aktivität auf eine Enzym-inhibition der Topoisomerase I zurückzuführen ist. Seither wurden die Forschungsaktivitäten wieder verstärkt, um verträglichere und in-vivo wirksame Camptothecin-Derivate zu finden.

20 Zur Verbesserung der Wasserlöslichkeit wurden Salze von A-Ring- und B-Ring-modifizierten Camptothecin-Derivaten sowie von 20-O-Acyl-Derivaten mit ionisierbaren Gruppen beschrieben (Vishnuvajjala et al. US 4943579). Letzteres Prodrug-Konzept wurde später auch auf modifizierte Camptothecin-Derivate übertragen (Wani et al. WO 9602546). Die beschriebenen 20-O-Acyl-Prodrugs haben allerdings 25 in-vivo eine sehr kurze Halbwertszeit und werden sehr schnell zum Grundkörper gespalten.

- In der WO 96/31532 sind kohlenhydratmodifizierte Cytostatika beschrieben, bei denen durch eine neuartige Verknüpfung von selektiv modifizierten Kohlenhydraten mit Cytostatika (beispielsweise Batracylin, Chinolon-a, Camptothecin) über bevorzugte Spacer- und Linkergruppen sowohl eine Serumstabilität und Freisetzung des Cytostatikums innerhalb der Tumorzellen als auch eine spezifische Anreicherung des Cytostatikums in Tumorgewebe erreicht wird. In dieser Schrift sind aber nur kohlenhydratmodifizierte Cytostatika beschrieben, bei denen die Linkereinheit eine Thioharnstoff- oder Triazingruppe ist.
- 10 In der WO 98/15571 sind Camptothecinderivate beschrieben, die eine kohlenhydratfreie Seitenkette an der C20-Position aufweisen, welche unter anderem eine Thioharnstoffgruppe als Linkereinheit aufweist.
- 15 In der WO 98/51703 sind kohlenhydratmodifizierte Cytostatika beschrieben, bei denen der Saccharidrest und das Camptothecin über eine Einheit Sp-LAA1-AA2 verknüpft sind, wobei L für eine Thioharnstoffeinheit steht.
- 20 In der WO 98/14459, WO 98/14468 und der WO 98/15573 sind weitere kohlenhydratmodifizierte Camptothecinderivate beschrieben.
- 25 Tumorzellen besitzen zahlreiche Möglichkeiten, eine Behandlung mit cytotoxischen Mitteln zu überstehen, weshalb nach wie vor Bedarf nach neuen Arzneimitteln zur Krebsbehandlung besteht. Da die zahlreichen Mechanismen, über die Tumorzellen die negativen Einflüsse von cytotoxischen Mitteln umgehen können, noch weitgehend nicht aufgeklärt sind, kann man schwer Vorhersagen darüber machen, inwieweit sich strukturelle Veränderungen bei bekannten Arzneimitteln hinsichtlich ihrer Wirkung auf Tumorzellen auswirken.
- 30 Es war die Aufgabe der vorliegenden Erfindung, weitere kohlenhydratmodifizierte Cytostatika zur Behandlung von Krebserkrankungen bereitzustellen.

- 5 -

Überraschend wurde nun gefunden, dass die Verbindungen der vorliegenden Erfindung eine hohe Wirksamkeit gegenüber verschiedenen Tumorzelllinien aufweisen.

Die vorliegende Erfindung betrifft Verbindungen der allgemeinen Formel (I)

5

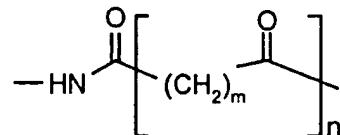


mit

10 K = unsubstituierter oder regioselektiv modifizierter Kohlenhydratrest

Sp = gegebenenfalls substituiertes Arylen oder Alkylen

L =



15

wobei

m eine ganze Zahl von 1 bis 6 bedeutet

20

n 0 oder 1 bedeutet

wobei die Verknüpfung zu Sp über die NH-Gruppe erfolgt.

25

AA1 eine direkte Bindung oder ein Aminosäure-Rest in der D- oder L-Konfiguration, der gegebenenfalls Schutzgruppen oder eine zweite Gruppierung K-Sp-L- trägt, in der K, Sp, L unabhängig von der anderen Gruppierung K-Sp-L- die oben angegebenen Bedeutungen haben können.

AA2 eine direkte Bindung oder ein Aminosäure-Rest in der D- oder L-Konfiguration, der gegebenenfalls Schutzgruppen oder eine zweite Gruppierung K-Sp-L- trägt, in der K, Sp, L unabhängig von der anderen Gruppierung K-Sp-L- die oben angegebenen Bedeutungen haben können.

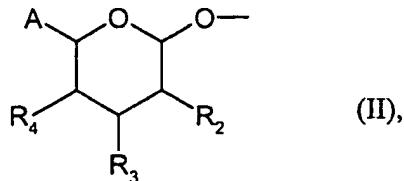
5

C ein cytotoxischer Rest oder der Rest eines Cytostatikums oder Cytostatikum-derivats ist, der zusätzlich eine Hydroxy- oder Aminogruppe tragen kann und über eine Ester- oder Amidgruppe an AA2 gebunden ist,

10 und deren Isomere und Salze.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung Verbindungen der allgemeinen Formel (I), bei denen

15 K Kohlenhydratrest mit der allgemeinen Formel (II)



wobei

20 A Methyl, Hydroxymethyl, Carboxy sowie davon abgeleitete Ester und Amide, Alkoxymethyl, Acyloxymethyl oder Carboxyalkyloxymethyl sowie davon abgeleitete Ester und Amide oder $\text{CH}_2\text{-B}$ bedeutet,

wobei

25

B wiederum ein über das anomere Zentrum verknüpfter Kohlenhydratrest der allgemeinen Formel (II) ist.

R₂, R₃, R₄ einzeln oder zusammen gleich H, Hydroxy, Alkyloxy, Carboxy-alkyloxy sowie davon abgeleitete Ester und Amide, Hydroxyalkyloxy, Aminoalkyloxy, Acyloxy, Carboxyalkylcarbonyloxy, Sulfato, Phosphato, Halogen, oder ein weiterer modifizierter und über das anomere Zentrum verknüpfter Kohlenhydratrest (II) bedeutet, wobei R₂ zusätzlich auch Amino oder Acylamino sein kann und/oder zwei der Reste R₂, R₃, R₄ auch zusammen eine Epoxygruppe bilden können,

10 und Sp, L, m, n, AA1, AA2 und C die gleiche Bedeutung wie vorstehend beschrieben haben.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung Verbindungen der Formel (I), bei denen

15 Sp Arylen, das ortho-, meta- oder para-ständig mit K und L modifiziert ist und darüber hinaus noch 1 bis 4 weitere Substituenten tragen kann, die unabhängig oder gleich H, Methyl, Methoxy, Hydroxy, Carboxy, Methyloxy-carbonyl, Cyano, Nitro, Halogen, Sulfonyl oder Sulfonamid sein können, oder 20 ein linearer oder verzweigter Alkylen-Rest ist,

und K, L, m, n, AA1, AA2 und C die gleiche Bedeutung wie vorstehend beschrieben haben.

25 Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung Verbindungen der Formel (I), bei denen

30 C ein Nucleosid, ein Endiin-Antibiotikum oder ein cytotoxisches Peptidantibiotikum, eine Chinolon- oder Naphthyridoncarbonsäure oder Batracylin, 5-Fluorouracil, Cytosinarabinosid, Methotrexat, Etoposid, Camptothecin, Daunomycin, Doxorubicin, Taxol, Vinblastin, Vincristin, Dynemicin,

5 Calicheamycin, Esperamycin, Quercetin, Suramin, Erbstatin, Cyclophosphamide, Mitomycin C, Melphalan, Cisplatin, Bleomycin, Staurosporin oder ein anderer antineoplastisch aktiver Wirkstoff sein kann, der zusätzlich eine Hydroxy- oder Aminogruppe tragen kann und über eine Ester- oder Amidgruppe an AA2 gebunden ist,

10 und K, Sp L, m, n, AA1 und AA2 die gleiche Bedeutung wie vorstehend beschrieben haben.

15 10 Insbesondere bevorzugt sind hierbei Verbindungen, bei denen C für einen Camptothecinrest oder den Rest eines Camptothecinderivats steht.

15 15 Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung Verbindungen der Formel (I), bei denen n gleich 0 ist. Insbesondere sind hierbei Verbindungen der Formel (I) bevorzugt, bei denen zusätzlich AA1 eine Direktbindung ist.

20 20 Gemäß der vorliegenden Erfindung sollen unter einem Kohlenhydratrest K Polyhydroxyaldehyde (Aldosen) oder Polyhydroxyketone (Ketosen) sowie höhermolekulare Verbindungen, die sich durch Hydrolyse in solche Verbindungen überführen lassen, verstanden werden. Insbesondere sollen unter diesem Begriff Monosaccharide, d.h. monomere Polyhydroxyaldehyde oder Polyhydroxyketone, oder Oligosaccharide, d.h. dimere bis decamere (Disaccharide, Trisaccharide usw.) Polyhydroxyaldehyde oder Polyhydroxyketone, verstanden werden. Beispielhaft seien Pentosen und Hexosen wie z. B. Ribose, Xylose, Arabinose, Glucose, Mannose, Galactose, Gulose, Fructose, Sorbose, Fucose und Rhamnose genannt. Als Beispiele für Oligosaccharide seien Disaccharide wie Saccharose, Lactose und Maltose genannt. Erfindungsgemäß können die Kohlenhydrate in der D- oder L-Form vorliegen. Insbesondere bevorzugt sind L-Fucose und D-Galactose.

30

- Die Kohlenhydratreste K können erfahrungsgemäß unsubstituiert oder regioselektiv modifiziert sein. Unter regioselektiver Modifizierung soll hierbei die Substitution einer oder mehrerer Hydroxygruppen des Kohlenhydratrestes durch Alkyloxy, Carboxyalkyloxy sowie davon abgeleitete Ester und Amide wie beispielsweise die entsprechenden C₁₋₆-Alkylester oder C₁₋₆-Mono- oder Dialkylamide, Hydroxyalkyloxy, Aminoalkyloxy, Acyloxy, Carboxyalkylcarbonyloxy, Sulfato, Phosphato, Halogen oder gegebenenfalls Amino oder Acylamino verstanden werden. Weiterhin können zwei der Reste R₂, R₃, R₄ auch zusammen eine Epoxygruppe bilden. Zudem können eine oder mehrere Hydroxygruppen des Kohlenhydratrestes durch einen weiteren, ebenfalls entsprechend modifizierten und über das anomere Zentrum verknüpften Kohlenhydratrest substituiert sein. Es können aber auch eine oder mehrere Hydroxygruppen des Kohlenhydratrestes durch Wasserstoff ersetzt und auf diese Weise der Kohlenhydratrest in einen sogenannten Desoxyzuckerrest überführt sein.
- 15 Besonders bevorzugt ist hierbei die regioselektive Modifizierung des Kohlenhydratrestes K durch Überführung einer oder mehrerer Hydroxygruppen in einen C₁₋₆-Alkoxyrest wie beispielsweise Methoxy, Ethoxy, Propoxy oder Butoxy, in einen Hydroxyalkoxyrest wie beispielsweise Hydroxyethoxy, in einen Carboxyalkoxyrest oder ein Ester- oder Amidderivat davon wie beispielsweise Carboxymethoxy, 20 Methylcarbonylmethoxy, Aminocarbonylmethoxy, Methylaminocarbonylmethoxy, Ethylaminocarbonylmethoxy, Propylaminocarbonylmethoxy, Butylaminocarbonylmethoxy, in einen Carboxyalkylrest oder ein Ester- oder Amidderivat davon wie beispielsweise Methylcarbonyloxymethyl, in eine Carboxygruppe oder ein Ester- oder Amidderivat davon wie beispielsweise Carboxyethyloxycarbonyl, in einen Halogenrest wie beispielsweise Cl oder Br oder in einen Sulfatrest.
- 25 C₁-C₆-Alkyl umfaßt erfahrungsgemäß Methyl, Ethyl, n- und i-Propyl, n-, i-, sek.- und tert.-Butyl, n-Pentyl, Isopentyl, Neopentyl, Hexyl.
- 30 (C₁-C₆)-Alkoxy steht für einen geradkettigen oder verzweigten Alkoxyrest mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen. Bevorzugt ist ein geradkettiger oder verzweigter Alkoxyrest

mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen. Beispielsweise seien genannt: Methoxy, Ethoxy, n-Propoxy, Isopropoxy, tert.Butoxy, n-Pentoxy und n-Hexaoxy. Besonders bevorzugt ist ein geradkettiger oder verzweigter Alkoxyrest mit 1 bis 3 Kohlenstoffatomen.

5 (C₁-C₆)-Alkoxycarbonyl steht für einen geradkettigen oder verzweigten Alkoxy-carbonylrest mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen. Bevorzugt ist ein geradkettiger oder verzweigter Alkoxycarbonylrest mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen. Beispielsweise seien genannt: Methoxycarbonyl, Ethoxycarbonyl, n-Propoxycarbonyl, Isopropoxy-carbonyl und tert.Butoxycarbonyl. Besonders bevorzugt ist ein geradkettiger oder 10 verzweigter Alkoxycarbonylrest mit 1 bis 3 Kohlenstoffatomen.

(C₁-C₆)-Acyl steht im Rahmen der Erfindung für einen geradkettigen oder verzweigten Acylrest mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen. Beispielsweise seien genannt: Acetyl, Ethylcarbonyl, Propylcarbonyl, Isopropylcarbonyl, Butylcarbonyl, Isobutyl-carbonyl, Pentylcarbonyl und Hexylcarbonyl. Bevorzugt ist ein geradkettiger oder verzweigter Acylrest mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen. Besonders bevorzugt sind 15 Acetyl und Ethylcarbonyl.

Sind eine oder mehrere Hydroxygruppen des Kohlenhydratrests K durch Kohlenhydratreste substituiert, so können diese unabhängig vom primären Kohlenhydratrest ebenfalls wie vorstehend beschrieben regioselektiv modifiziert oder unsubstituiert sein. Diese weiteren Kohlenhydratreste sind erfindungsgemäß immer über ihr anomeres Zentrum mit dem primären Kohlenhydratrest verknüpft.

25 Durch diese regioselektive Modifizierung kann die Verbindung spezifisch an Tumorzellen adressiert werden und erfährt dadurch eine erhöhte Gewebeselektivität und Wirkung.

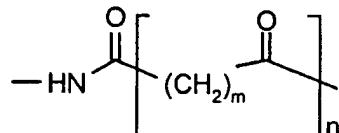
Der Kohlenhydratrest K ist über eine Spacergruppe Sp an den Rest des Moleküls gebunden. Erfindungsgemäß kann Sp ein gegebenenfalls substituiertes Alkylen (auch 30 als Alkandiyl bezeichnet) oder Arylen sein. Bevorzugt ist erfindungsgemäß ein

C₂-C₈-Alkandiylrest, d.h. ein geradkettiger oder verzweigter Alkandiylrest mit 2 bis 8 Kohlenstoffatomen. Besonders bevorzugt ist ein geradkettiger oder verzweigter Alkandiylrest mit 2 bis 6 Kohlenstoffatomen, besonders bevorzugt mit 2 bis 4 Kohlenstoffatomen. Beispielsweise seien genannt: Ethylen, Propylen, Propan-1,2-diyl, Propan-2,2-diyl, Butan-1,3-diyl, Butan-2,4-diyl, Pentan-2,4-diyl, 2-Methylpentan-2,4-diyl. Arylen steht erfindungsgemäß für einen aromatischen Kohlenwasserstoffrest mit 6 bis 10 Kohlenstoffatomen im cyclischen Gerüst. Beispielsweise seien 1,4-Phenylen, 1,3-Phenylen, 1,2-Phenylen oder Naphthylen genannt. Der Alkandiyl- oder Arylenspacer kann darüber hinaus noch ein- oder mehrfach, vorzugsweise bis zu vierfach substituiert sein mit einem oder mehreren Resten aus der Gruppe, bestehend aus H, Methyl, Methoxy, Hydroxy, Carboxy, Methyloxycarbonyl, Cyano, Nitro, Halogen, Sulfonyl oder Sulfonamid.

10

Die Linkergruppe L ist erfindungsgemäß eine Einheit der Formel

15



wobei

20

m eine ganze Zahl von 1 bis 6 bedeutet

n 0 oder 1 bedeutet

wobei die Verknüpfung zu Sp über die NH-Gruppe erfolgt.

25

Erfindungsgemäß bevorzugt sind Verbindungen, bei denen n 0 ist (d.h. L eine Harnstoffeinheit ist), oder bei denen n gleich 1 und m eine ganze Zahl von 1 bis 4 bedeutet (d.h. L ist eine Malonsäure-, Bernsteinsäure-, Glutarsäure- oder Adipinsäureeinheit).

Die Linkergruppe L kann entweder direkt oder über eine oder zwei Aminosäuregruppen AA1 und AA2 mit dem cytotoxischen Rest verknüpft sein.

Die Aminosäure-Reste AA1 und AA2 können unabhängig voneinander in der D- oder L-Konfiguration vorliegen und gegebenenfalls eine zweite Gruppierung K-Sp-L- tragen, in der K, Sp, L unabhängig von der anderen Gruppierung K-Sp-L- die oben angegebenen Bedeutungen haben können.

Der Aminosäurerest AA1 kann sowohl über die α -Aminogruppe als auch gegebenenfalls über Seitenketten-amino- oder -hydroxyfunktionen oder auch über beide Funktionen mit L verknüpft sein. Falls AA1 weitere funktionelle Gruppen trägt, so können diese deblockiert oder mit dem Fachmann bekannten Schutzgruppen (d.h. organische Reste, mit denen bestimmte funktionelle Gruppen eines mehrere aktive Zentren enthaltenden Mol. vorübergehend gegen den Angriff von Reagenzien geschützt werden können) geschützt vorliegen (vgl. z.B. Kocienski, Protecting Groups, Stuttgart, Thieme 1994). Schutzgruppen im Rahmen der Erfindung sind die üblichen in der Peptid-Chemie verwendeten Aminoschutzgruppen. Hierzu gehören bevorzugt: Benzyloxycarbonyl, 3,4-Dimethoxybenzyloxycarbonyl, 3,5-Dimethoxybenzyloxycarbonyl, 2,4-Dimethoxybenzyloxycarbonyl, 4-Methoxybenzyloxycarbonyl, 4-Nitrobenzyloxycarbonyl, 2-Nitrobenzyloxycarbonyl, 2-Nitro-4,5-dimethoxybenzyloxycarbonyl, Methoxycarbonyl, Ethoxycarbonyl, tert-Butoxycarbonyl (Boc), Allyloxycarbonyl, Vinyloxycarbonyl, 3,4,5-Trimethoxybenzyloxycarbonyl, Phthaloyl, 2,2,2-Trichlorethoxycarbonyl, 2,2,2-Trichlor-tert-butoxycarbonyl, Menthoxycarbonyl, 4-Nitrophenoxy carbonyl, Fluorenyl-9-methoxycarbonyl (Fmoc), Formyl, Acetyl, Propionyl, Pivaloyl, 2-Chloracetyl, 2-Bromacetyl, 2,2,2-Trifluoracetyl, 2,2,2-Tri chloracetyl, Benzoyl, Benzyl, 4-Chlorbenzoyl, 4-Brombenzoyl, 4-Nitrobenzoyl, Phthalimido, Isovaleroyl oder Benzyloxymethylen, 4-Nitrobenzyl, 2,4-Dinitrobenzyl, 4-Nitrophenyl oder 2-Nitrophenylsulfenyl. Besonders bevorzugt sind die Fmoc-Gruppe und die Boc-Gruppe.

Die Abspaltung von Schutzgruppen in entsprechenden Reaktionsschritten kann zum Beispiel durch Säure- oder Base-Einwirkung, hydrogenolytisch oder auf andere Weise reduktiv erfolgen.

5 Der Aminosäurerest AA2 kann sowohl über die α -Aminogruppe als auch gegebenenfalls über Seitenketten-amino- oder -hydroxyfunktionen oder auch über beide Funktionen mit AA1 verknüpft sein. Falls AA2 weitere funktionelle Gruppen trägt, so können diese deblockiert oder mit dem Fachmann bekannten, bereits vorstehend bei AA1 beschriebenen Schutzgruppen geschützt vorliegen.

10 Erfindungsgemäß bevorzugt stehen AA1 und AA2 insbesondere für die in der Natur vorkommenden α -Aminosäuren, umfasst darüber hinaus aber auch deren Homologe, Isomere und Derivate. Als Beispiel für Isomere können Enantiomere genannt werden. Derivate können beispielsweise mit Schutzgruppen versehene Aminosäuren 15 sein.

AA1 und AA2 können in der L- oder in der D-Konfiguration auftreten oder auch als Gemisch von D- und L-Form. Besonders bevorzugt steht AA1 für eine Aminosäure mit basischer Seitenkette. Besonders bevorzugt steht AA2 für eine Aminosäure mit 20 sterisch anspruchsvoller bzw. unpolarer Seitenkette.

Unter Aminosäuren mit „sterisch anspruchsvollen“ Seitenketten werden solche Aminosäuren verstanden, deren Seitenkette in der β - oder γ -Position eine Verzweigung aufweist; als Beispiele seien Valin und Isoleucin bzw. Leucin genannt.

25 Als typische Beispiele für Aminosäuren mit unpolaren Seitenketten seien genannt: Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Prolin, Tryptophan, Phenylalanin, Methionin.

Als typische Beispiele für Aminosäure mit basischen Seitenketten seien genannt: 30 Lysin, Arginin, Histidin, Ornithin, Diaminobuttersäure.

Eine derartige vorstehend beschriebene Seitenkette K-Sp-L-AA1-AA2 ist bei Verknüpfung mit einem cytotoxischen Rest in der Lage, diesen selektiver in das Tumorgewebe einzubringen, wo er seine cytotoxische Wirkung entfalten kann. Das hier beschriebene erfindungsgemäße Prinzip ist breit auf cytotoxische und cytostatische Verbindungen anwendbar. Unter Cytotoxizität wird die Eigenschaft von Substanzen verstanden, andere Zellen zu inaktivieren oder abzutöten. Erfindungsgemäß wird unter einem cytotoxischen Rest ein mit der Einheit K-Sp-L- verknüpfte Gruppe verstanden, die zumindest nach der Freisetzung aus dem Molekül cytotoxische Wirkung zeigt. Dabei handelt es sich um im freigesetzten Zustand bekannte cytotoxische oder cytostatische Verbindungen wie beispielsweise den Rest eines Nucleosids, eines Endiin-Antibiotikums oder eines cytotoxisches Peptidantibiotikums z.B. aus der Klasse der Dolastatine oder eine Chinolon- oder Naphthyridoncarbonsäure sein. C kann beispielsweise Batracylin, 5-Fluorouracil, Cytosinarabinosid, Methotrexat, Etoposid, Camptothecin, Daunomycin, Doxorubicin, Taxol, Vinblastin, Vincristin, Dynemicin, Calicheamycin, Esperamycin, Quercetin, Suramin, Erbstatin, Cyclophosphamid, Mitomycin C, Melphalan, Cisplatin, Bleomycin, Staurosporin oder ein anderer antineoplastisch aktiver Wirkstoff sein. Bevorzugt ist C Batracylin, Methotrexat, Chinolon-a, Etoposid, Melphalan, Taxol, Camptothecin, Daunomycin oder Doxorubicin oder eine Chinolon- oder Naphthyridoncarbonsäure.

20

Das Cytostatikum ist über Amino- oder Hydroxyfunktionen mit AA2 verknüpft.

25

Die vorstehend genannten, erfindungsgemäß geeigneten Chinolon- oder Naphthyridoncarbonsäurebausteine C lassen sich durch die allgemeine Struktur der Formel (III) darstellen,

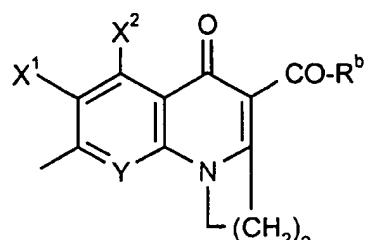
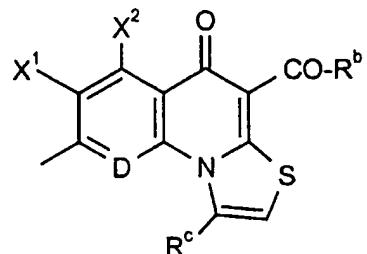
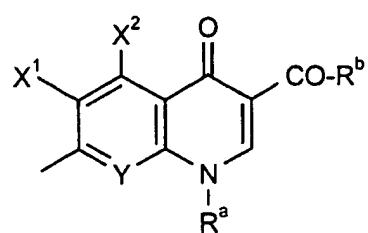
T-Q

(III)

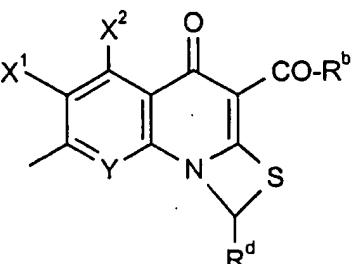
30

in welcher

Q einen Rest der Formeln



oder



bedeutet, worin

- 5 R^a für gegebenenfalls durch Halogen oder Hydroxy ein- oder zweifach substituiertes Alkyl mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen, Vinyl, gegebenenfalls durch 1 oder 2 Fluoratome substituiertes Cycloalkyl mit 3 bis 6 Kohlenstoffatomen, Bicyclo[1.1.1]pent-1-yl, 1,1-Dimethylpropargyl, 3-Oxetanyl, Methoxy, Amino, Methylamino, Dimethylamino, gegebenenfalls durch Halogen, Amino oder Hydroxy ein- oder zweifach substituiertes Phenyl steht oder auch gemeinsam mit R^c eine dort beschriebene Brücke bilden kann,

10

15 R^b für Hydroxy, Alkoxy mit 1 bis 3 Kohlenstoffatomen, Nitromethyl,

20 R^c für Wasserstoff oder Methyl steht oder auch gemeinsam mit R^a eine dort beschriebene Brücke bilden kann,

25 R^d für Wasserstoff, CH₃, CH₂F oder =CH₂,

30 X¹ für Wasserstoff, Halogen oder Nitro,

- 16 -

X² für Wasserstoff, Halogen, Amino, Hydroxy, Methoxy, Mercapto, Methyl, Halogenmethyl oder Vinyl,

Y für N oder C-R^c steht, worin

5

R^c für Wasserstoff, Halogen, CF₃, OCH₃, OCHF₂, CH₃, CN, CH=CH₂ oder C≡CH steht oder auch gemeinsam mit R^a eine Brücke der Struktur -^{*}O-CH₂-CH-CH₃, -^{*}S-CH₂-CH₂-^{*}, -^{*}S-CH₂-CH-CH₃, -^{*}CH₂-CH₂-CH-CH₃ oder -^{*}O-CH₂-N-R^f, wobei das mit * markierte Atom mit dem Kohlenstoffatom von Y verknüpft ist und worin

10

R^f Wasserstoff, Methyl oder Formyl bedeutet,

bilden kann, und

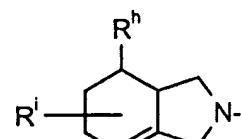
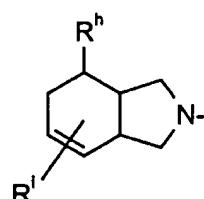
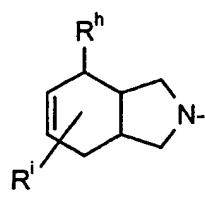
15

D für N oder C-R^g steht, worin

R^g für Wasserstoff, Halogen, CF₃, OCH₃, OCHF₂ oder CH₃ steht oder auch gemeinsam mit R^c eine Brücke der Struktur -^{*}O-CH₂-^{*}, -^{*}NH-CH₂-^{*}, -^{*}N(CH₃)-CH₂-^{*}, -^{*}N(C₂H₅)-CH₂-^{*}, -^{*}N(C₃H₅)-CH₂- oder -^{*}S-CH₂- bilden kann, wobei das mit * markierte Atom mit dem Kohlenstoffatom von D verknüpft ist,

o 1, 2 oder 3 und

25 T einen Rest der Formel



bedeutet, worin

R^h für O -, $-N-R^k$, CH_2-O - oder $-C(H_2)-N-R^k$ steht, wobei

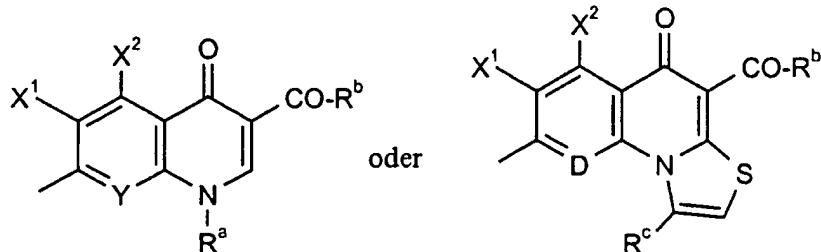
R^k für Wasserstoff oder Methyl und

5

R^i für Wasserstoff, C_1-C_3 -Alkyl oder Cyclopropyl steht.

Besonders bevorzugt sind hierbei Verbindungen der Formel (III), in welcher

10 Q einen Rest der Formel



bedeutet, worin

15 R^a für gegebenenfalls durch 1 Fluoratom substituiertes Alkyl mit 2 bis 4 Kohlenstoffatomen, gegebenenfalls durch 1 Fluoratom substituiertes Cyclopropyl, gegebenenfalls durch Fluor ein- oder zweifach substituiertes Phenyl,

20

R^b für Hydroxy, Alkoxy mit 1 bis 2 Kohlenstoffatomen,

R^c für Wasserstoff, Methyl steht oder zusammen mit R^g eine dort beschriebene Brücke bilden kann,

25

X^1 für Fluor,

5 X^2 für Wasserstoff oder Amino,

10 Y für N oder C- R^e steht, worin

15 R^e für Wasserstoff, Fluor, Chlor, CF_3 , OCH_3 , $OCHF_2$, oder $C\equiv CH$ steht oder auch gemeinsam mit R^a eine Brücke der Struktur $-\overset{*}{O}-CH_2-CH-CH_3$ oder $-\overset{*}{O}-CH_2-N-R^f$,

20 wobei das mit $*$ markierte Atom mit dem Kohlenstoffatom von Y verknüpft ist und worin

25 R^f Methyl bedeutet,

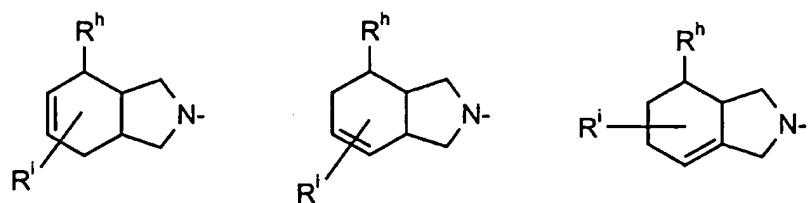
30 bilden kann,

35 D für N oder C- R^g steht, worin

40 R^g für Wasserstoff, Fluor, Chlor, CF_3 , OCH_3 oder CH_3 steht oder auch gemeinsam mit R^c eine Brücke der Struktur $-\overset{*}{O}-CH_2-$, $-\overset{*}{NH}-CH_2-$, $-\overset{*}{N}(CH_3)-CH_2-$ oder $-\overset{*}{S}-CH_2-$ bilden kann,

45 wobei das mit $*$ markierte Atom mit dem Kohlenstoffatom von D verknüpft ist und

50 T einen Rest der Formel



55 bedeutet, worin

R^h für $-\overset{|}{N}R^k$ steht, worin

R^k für Wasserstoff oder Methyl steht,

5

R^i für Wasserstoff oder Methyl steht.

Erfnungsgemäß besonders bevorzugt steht C für Camptothecin oder ein Camptothecinderivat wie 9-Aminocamptothecin.

10

Die erfundungsgemäßen Verbindungen können in Form ihrer Salze vorliegen. Im allgemeinen seien hier Salze mit organischen oder anorganischen Säuren genannt. Diese Salze können durch Umsetzung der freien Verbindungen der Formel (I) mit organischen oder anorganischen Säuren hergestellt werden. Als Säuren kommen hier-

15

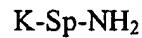
bei erfundungsgemäß vorzugsweise Halogenwasserstoffsäuren, wie z.B. die Chlorwasserstoffsäure und die Bromwasserstoffsäure, insbesondere die Chlorwasserstoffsäure, ferner Phosphorsäure, Salpetersäure, Schwefelsäure, mono- und bifunktionelle Carbonsäuren und Hydroxycarbonsäuren, wie z.B. Essigsäure, Trifluoressigsäure, Maleinsäure, Malonsäure, Oxalsäure, Gluconsäure, Bernsteinsäure, Fumarsäure, 20 Weinsäure, Zitronensäure, Salizylsäure, Sorbinsäure und Milchsäure sowie Sulfonsäuren, wie z.B. p-Toluolsulfonsäure, 1,5-Naphthalindisulfonsäure oder Campher-sulfonsäure in Frage.

20

Die erfundungsgemäßen Verbindungen können in stereoisomeren Formen, beispielsweise als Enantiomere oder Diastereomere, oder als deren Gemische, beispielsweise als Racemat, vorliegen. Die Erfindung betrifft sowohl die reinen Stereoisomere als auch deren Gemische.

Die Stereoisomerengemische können, falls erforderlich, in bekannter Weise in die stereoisomer einheitlichen Bestandteile getrennt werden, beispielsweise durch Chromatographie oder durch Kristallisationsverfahren.

5 Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur Herstellung der Verbindungen der Formel (I), umfassend die Umsetzung einer Verbindung der Formel



10 wobei

K und Sp die vorstehend beschriebene Bedeutung haben,
mit

15 a) einem Chlorameisensäureester in Gegenwart einer Base in einem organischen
Lösungsmittel

oder

20 b) einer Alkandicarbonsäure oder einem Dicarboxylderivat davon in Gegenwart
einer Base in einem organischen Lösungsmittel

und die anschließende Umsetzung mit einer Verbindung der Formel

25 AA1-AA2-C

wobei

AA1, AA2 und C die vorstehend beschriebene Bedeutung haben,

30 in Gegenwart einer Base in einem organischen Lösungsmittel.

Die Darstellung von Verbindungen K-Sp-NH₂ ist beispielsweise in der WO 96/31532 (Beispiele 1 bis 18) beschrieben, deren diesbezüglicher Inhalt hiermit in Bezug genommen ist.

5

Die Darstellung von Verbindungen AA1-AA2-C ist ebenfalls beispielsweise in der WO 96/31532 (Beispiele 1 bis 18) beschrieben, deren diesbezüglicher Inhalt hiermit in Bezug genommen ist.

10 Als Chlorameisensäureester können beliebige Ester wie beispielsweise Methyl-, Ethyl- oder p-Nitrophenylester verwendet werden. Erfindungsgemäß bevorzugt ist der Chlorameisensäure-p-nitrophenylester.

15 Die Umsetzung der Verbindung der Formel K-Sp-NH₂ mit dem Chlorameisensäure-ester kann bei verschiedenen Druck- und Temperaturverhältnissen, beispielsweise 0,5 bis 2 bar und vorzugsweise unter Normaldruck, bzw. -30 bis +100°C und vorzugsweise -10 bis + 80°C, in geeigneten Lösungsmitteln wie Dimethylformamid (DMF), Tetrahydrofuran (THF), Dichlormethan, Chloroform, niederen Alkoholen, Acetonitril, Dioxan, Wasser oder in Gemischen der genannten Lösungsmittel durchgeführt werden. In der Regel sind Reaktionen in Dimethylformamid (DMF), Dichlormethan, 20 Tetrahydrofuran (THF), Dioxan/Wasser oder THF/Dichlormethan bei Raumtemperatur oder unter Eiskühlung und Normaldruck bevorzugt. Erfindungsgemäß besonders bevorzugt ist die Umsetzung in Tetrahydrofuran bei Raumtemperatur und Normaldruck. Die Verbindungen werden dabei äquimolar bzw. der Chlorameisensäureester in leichtem Überschuss gegenüber der Verbindung K-Sp-NH₂ eingesetzt. Die Base wird entweder äquimolar oder im (beispielsweise zweifachem) Überschuss eingesetzt. Die Reaktion ist in der Regel nach wenigen (ca. 5-45) Minuten abgeschlossen.

30 Diese Reaktion wird in Gegenwart einer Base durchgeführt. Als Beispiele für erfindungsgemäß geeignete Basen seien Triethylamin, Ethyl-diisopropylamin, Pyridin,

N,N-Dimethylaminopyridin oder andere in derartigen Schritten herkömmlich verwendete Basen genannt.

Wahlweise kann die Verbindung der Formel K-Sp-NH₂ auch mit einer Alkandi-
5 carbonsäure oder einem Dicarboxylderivat davon in Gegenwart einer Base in einem organischen Lösungsmittel umgesetzt werden. Erfindungsgemäß bevorzugt ist hierbei die Verwendung des entsprechenden Dicarbonsäureanhydrids. Diese Umsetzung kann bei verschiedenen Druck- und Temperaturverhältnissen, beispielsweise 0,5 bis 2 bar und vorzugsweise unter Normaldruck, bzw. -30 bis +100°C und vorzugsweise
10 -10 bis +80°C, in geeigneten Lösungsmitteln wie Dimethylformamid (DMF), Tetrahydrofuran (THF), Dichlormethan, Chloroform, niederen Alkoholen, Acetonitril, Dioxan, Wasser oder in Gemischen der genannten Lösungsmittel durchgeführt werden. In der Regel sind Reaktionen in Dimethylformamid (DMF), Dichlormethan,
15 Tetrahydrofuran (THF), Dioxan/Wasser oder THF/Dichlormethan bei Raumtemperatur oder unter Eiskühlung und Normaldruck bevorzugt. Erfindungsgemäß besonders bevorzugt ist die Umsetzung in DMF bei Raumtemperatur und Normaldruck. Die Verbindungen werden dabei äquimolar bzw. der Chlorameisensäureester in leichtem Überschuss gegenüber der Verbindung K-Sp-NH₂ eingesetzt. Die Base wird entweder äquimolar oder im (beispielsweise zweifachem) Überschuss eingesetzt. Die
20 Reaktion ist in der Regel nach wenigen (ca. 5-45) Minuten abgeschlossen.

Auch diese Reaktion wird in Gegenwart einer Base durchgeführt. Als Beispiele für erfindungsgemäß geeignete Basen seien Triethylamin, Ethyl-diisopropylamin, Pyridin, N,N-Dimethylaminopyridin oder andere in derartigen Schritten herkömmlich verwendete Basen genannt.
25

Das aus einer dieser Reaktionen erhaltene Zwischenprodukt wird anschließend mit der Verbindung der Formel AA1-AA2-C in Gegenwart einer Base zur Verbindung der Formel (I) umgesetzt. Als Beispiele für erfindungsgemäß geeignete Basen seien Triethylamin, Ethyl-diisopropylamin, Pyridin, N,N-Dimethylaminopyridin oder andere in derartigen Schritten herkömmlich verwendete Basen genannt. Die Ver-
30

bindungen werden dabei äquimolar bzw. die Verbindung AA1-AA2-C in leichtem Überschuss gegenüber der Verbindung K-Sp-NH₂ eingesetzt. Die Base wird entweder äquimolar oder im (beispielsweise zweifachem) Überschuss eingesetzt. Diese Umsetzung kann bei verschiedenen Druck- und Temperaturverhältnissen, beispielsweise 5 0,5 bis 2 bar und vorzugsweise unter Normaldruck, bzw. -30 bis +100°C und vorzugsweise -10 bis + 80°C, in geeigneten Lösungsmitteln wie Dimethylformamid (DMF), Tetrahydrofuran (THF), Dichlormethan, Chloroform, niederen Alkoholen, Acetonitril, Dioxan, Wasser oder in Gemischen der genannten Lösungsmittel durchgeführt werden. In der Regel sind Reaktionen in Dimethylformamid (DMF), Dichlormethan, Tetrahydrofuran (THF), Dioxan/Wasser oder THF/Dichlormethan bei Raumtemperatur oder unter Eiskühlung und Normaldruck bevorzugt. Erfindungsgemäß besonders bevorzugt ist die Umsetzung in DMF oder THF bei Raumtemperatur und Normaldruck. Gegebenenfalls kann die Reaktion unter Anwendung von Ultraschall beschleunigt beziehungsweise unter Erzielung besserer Ausbeuten durchgeführt werden. Die Reaktion kann zwischen 30 Minuten bis zu mehreren, beispielsweise 15 16 Stunden benötigen.

Im Fall der Umsetzung der Verbindung der Formel AA1-AA2-C mit einer Verbindung, die aus der Reaktion von K-Sp-NH₂ mit einer Alkandicarbonsäure oder einem Derivat davon erhalten wurde, kann es notwendig sein, die freie Carboxylfunktion der letzteren Verbindung zu aktivieren. Für die Aktivierung der Carboxylgruppe kommen die in der Peptidchemie bekannten Kupplungsreagenzien wie sie z.B. in Jakubke/Jeschke: Aminosäuren, Peptide, Proteine; Verlag Chemie 1982 oder Tetrahedr. Lett. 34, 6705 (1993) beschrieben sind, in Frage. Bevorzugt sind beispielsweise N-Carbonsäureanhydride, Säurechloride oder gemischte Anhydride. 20 25

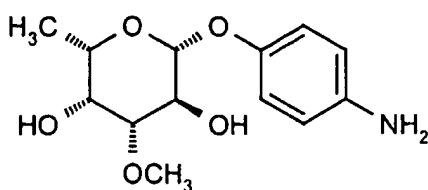
Weiterhin geeignet zur Aktivierung der Carboxylgruppe ist die Bildung von Addukten mit Carbodiimiden z.B. N,N'-Diethyl-, N,N'-Diisopropyl-, N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid, N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethyl-carbodiimid-Hydrochlorid, 30 N-Cyclohexyl-N'-(2-morpholinoethyl)-carbodiimid-metho-p-toluolsulfonat oder Carbonylverbindungen wie Carboxyldiimidazol, oder 1,2-Oxazoliumverbindungen wie

2-Ethyl-5-phenyl-1,2-oxazolium-3-sulfat oder 2-tert-Butyl-5-methyl-isoazolium-perchlorat, oder Acylaminoverbindungen wie 2-Ethoxy-1-ethoxycarbonyl-1,2-dihydrochinolin, oder Propanphosphonsäureanhydrid, oder Isobutylchloroform, oder Benzotriazolyloxy-tris-(dimethylamino)-phosphonium-hexafluorophosphat, 1-Hydroxybenzotriazol- oder N-Hydroxysuccinimidester.

Die vorliegende Erfindung wird nachstehend anhand von nicht einschränkenden Beispielen und Vergleichsbeispielen veranschaulicht.

BeispieleA) Ausgangsverbindungen

5 I) p-Aminophenyl-3-O-methyl- β -L-fucopyranosid:



I.a) p-Nitrophenyl-3-O-methyl- β -L-fucopyranosid:

10

20 g (70 mmol) p-Nitrophenyl- β -L-fucopyranosid (Herstellung vgl. WO 96/31532) in 1 l absol. Methanol werden mit 26,13 g (105 mmol) Dibutylzinnoxid versetzt und 23 h unter Rückfluß erhitzt. Anschließend wird eingeengt, der Rückstand getrocknet und dann in 1 l DMF aufgenommen. Nach Zugabe von 35 ml Methyliodid wird der Ansatz 16 h bei 70°C gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen. Die Suspension wird filtriert, die verbleibende Lösung erneut eingeengt und einer Flash-Chromatographie an Kieselgel (Dichlormethan/Methanol 99:1) unterzogen. Nach Einengen erhält man 17,4 g (83%) des Zielproduktes.

15

I) p-Aminophenyl-3-O-methyl- β -L-fucopyranosid:

20 g (29 mmol) p-Nitrophenyl-3-O-methyl- β -L-fucopyranosid aus Bsp. Ia) werden in 1,2 l Methanol gelöst und nach Zusatz von Palladium auf Aktivkohle in einer Wasserstoffatmosphäre bei geringem Überdruck hydriert. Nach Abfiltrieren des Katalysators, Fällen mit Ether und Waschen des Rückstandes mit Methanol wird das Zielprodukt in Wasser aufgenommen und lyophilisiert. Man erhält 7,4 g (95%). [DC: Dichlormethan/Methanol 9:1 R_f = 0,3].

II) 20(S)-20-O-L-Valyl-camptothecin, Trifluoracetat:II.a) 20(S)-20-O-[N-(tert-Butoxycarbonyl)-L-valyl]-camptothecin:

5 Eine Suspension von 40 g (115 mmol) 20(S)-Camptothecin in 2 l absolutem Dichlormethan wird unter Rühren mit 56 g (230 mmol) N-(tert-Butoxy-carbonyl)-L-valin-N-carbonsäureanhydrid sowie 4 g 4-(N,N-Dimethylamino)-pyridin versetzt. Nach 4 Tagen Rühren unter Rückfluß in einer Argonatmosphäre hat Camptothecin abgereagiert. Das Lösungsmittel wird abgedampft und der Rückstand mit 500 ml Methyl-10 tert.butyl-ether versetzt. Nach 20 min Rühren werden 750 ml Petrolether hinzugefügt und abfiltriert. Der Filterrückstand wird im Hochvakuum getrocknet. Man erhält 61,5 g (97 %) der Zielverbindung. [DC: Acetonitril/Wasser 20:1 $R_f = 0,35$].

II) 20(S)-20-O-L-Valyl-camptothecin, Trifluoracetat:

15 Eine Lösung von Verbindung II.a (61 g, 111 mmol) in 1,7 l Dichlormethan wird auf 5°C abgekühlt, mit 350 ml wasserfreier Trifluoressigsäure versetzt und dann für 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Einengen im Vakuum auf ein kleines Volumen wird das Produkt mit 1 l Methyl-tert.butyl-ether ausgefällt und 10min gerührt. Der 20 Niederschlag wird abfiltriert. Das Rohprodukt wird nochmals in 950 ml Methanol gelöst, filtriert und die Lösung dann mit 3,5 l Methyl-tert.butyl-ether gefällt. Der Niederschlag wird erneut abfiltriert und mit Methyl-tert.butyl-ether gewaschen. Der Prozess wird ggf. nochmals wiederholt. Ausb.: 38,6 g (60 %) [DC: Acetonitril/Wasser 20:1 $R_f = 0,38$].

III) 20(S)-20-O-{L-Histidyl-L-valyl}-camptothecin, Bis-Trifluoracetat:III.a) 20(S)-20-O-[N-(tert-Butoxycarbonyl)-L-histidyl-L-valyl]-camptothecin:

5 6,28 g (24,6 mmol) N-(tert-Butoxycarbonyl)-L-histidin und 5 g 1-Hydroxy-1H
benzotriazol Hydrat werden in 500 ml Dimethylformamid gelöst und die Lösung auf
0°C abgekühlt. Nach Zugabe von 5,64 g N-Ethyl-N'-(dimethylaminopropyl)-
10 carbodiimid Hydrochlorid röhrt man für 30 min bei 0°C. Anschließend setzt man
Verbindung II (11,5 g, 20,5 mmol) und 8,5 ml Ethyl-diisopropylamin zu und röhrt
den Ansatz für weitere 16 h bei Raumtemperatur. Nach Einengen im Vakuum wird
der Rückstand in 1 l Dichlormethan aufgenommen und dreimal mit 500 ml Wasser
extrahiert. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und ein-
geengt. Der Rückstand wird aus Dichlormethan mit Methyl-tert.butyl-ether gefällt
15 und mit Methyl-tert.butyl-ether gewaschen. Man erhält 12,8 g (91 %) der Zielver-
bindung. [DC: Acetonitril/Wasser 10:1 R_f = 0,33].

III) 20(S)-20-O-(L-Histidyl-L-valyl)-camptothecin, Bis-Trifluoracetat:

20 12,8 g (18,7 mmol) der Verbindung III.a werden in 180 ml Dichlormethan aufge-
nommen und bei 5°C mit 90 ml wasserfreier Trifluoressigsäure versetzt. Die re-
sultierende Lösung wird für 30 min gerührt und dabei auf Raumtemperatur auf-
wärmten lassen. Anschließend wird eine weitere Stunde bei Raumtemperatur gerührt.
Nach Einengen auf ein kleines Volumen im Vakuum wird das Produkt durch Zugabe
25 von Methyl-tert.butyl-ether ausgefällt und noch 30 min gerührt. Der Rückstand wird
abfiltriert und nach Trocknen im Vakuum erhält man 12,9 g (85 %) der Zielver-
bindung [DC: Acetonitril/Wasser/Eisessig 5:1:0,2 R_f = 0,25].

IV) 20(S)-20-O-{N^E-(Fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-L-lysyl-L-valyl}-camptothecin, Trifluoracetat:

IVa) 20(S)-20-O-[N^α-(tert-Butoxycarbonyl)-N^E-(fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-L-lysyl-L-valyl]-camptothecin:

22 g (47 mmol) N^α-(tert-Butoxycarbonyl)-N^E-(fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-L-lysin und 9,5 g (70 mmol) 1-Hydroxy-1H-benzotriazol Hydrat werden in 800 ml Dimethylformamid gelöst und auf 0°C abgekühlt. Nach Zugabe von 10,8 g (56 mmol) 10 N-Ethyl-N'-(dimethylaminopropyl)-carbodiimid Hydrochlorid röhrt man für 1 h bei 0°C. Anschließend setzt man Verbindung II (21,85 g, 39 mmol) und 24,3 ml Ethyl-diisopropylamin zu und röhrt den Ansatz für weitere 16 h bei Raumtemperatur. Nach Einengen im Vakuum gibt man 1,5 l Wasser zu dem Rückstand und röhrt 15 min. Der entstehende Feststoff wird abfiltriert, mit Wasser gewaschen und anschließend in 15 800 ml Dichlormethan aufgenommen. Nach Trocknung wird die organische Phase auf 150 ml eingeengt und mit 2 l Methyl-tert.butyl-ether gefällt. Der Rückstand wird abfiltriert und getrocknet. Man erhält 28,4 g (81%) des Zielproduktes. [DC: Acetonitril R_f = 0,47].

20 IV) 20(S)-20-O-{N^E-(Fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-L-lysyl-L-valyl}-camptothecin, Trifluoracetat:

Die Verbindung IVa (27,89 g, 31 mmol) wird in 600 ml Dichlormethan aufgenommen, auf 5°C abgekühlt und mit 200 ml wasserfreier Trifluoressigsäure versetzt. 25 Die resultierende Lösung wird auf Raumtemperatur aufwärmen lassen und 2 h geröhrt. Nach Einengen auf ein kleines Volumen im Vakuum wird das Produkt durch Zugabe von Methyl-tert.butyl-ether ausgefällt und getrocknet. Man erhält 26 g (92 %) der Zielverbindung [DC: Acetonitril/Wasser/Eisessig 5:1:0,2 R_f = 0,54].

V) 20(S)-20-O-{L-Asparaginyl-L-valyl}-camptothecin, Trifluoracetat:V.a) 20(S)-20-O-[N -(tert-Butoxycarbonyl)-L-asparaginyl-L-valyl]-camptothecin:

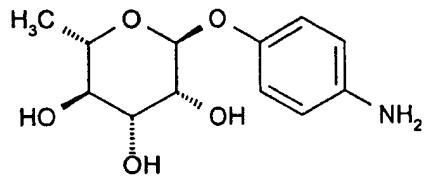
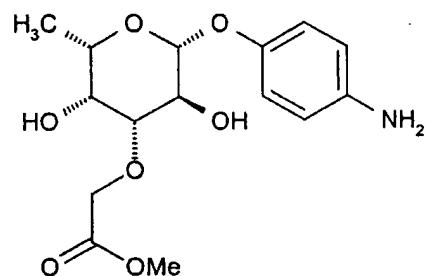
5 413,6 mg (1,78 mmol) N-(tert-Butoxycarbonyl)-L-asparigin und 361 mg 1-Hydroxy-
1H benzotriazol Hydrat werden in Dimethylformamid gelöst und die Lösung auf 0°C
abgekühlt. Nach Zugabe von 410 mg N-Ethyl-N'-(dimethylaminopropyl)-carbodi-
imid Hydrochlorid röhrt man für 30 min bei 0°C. Anschließend setzt man Ver-
bindung II (1 g, 1,78 mmol) und 690 mg Ethyl-diisopropylamin zu und röhrt den
10 Ansatz für weitere 16 h bei Raumtemperatur. Nach Einengen im Vakuum wird der
Rückstand mit Wasser verrührt und das Rohprodukt durch Flash-Chromatographie
an Kieselgel gereinigt [Dichlormethan/Methanol/Ammoiak 17%ig 15:0,5:0,05
->15:1:0,1. Entsprechende Fraktionen werden gesammelt und das Lösungsmittel
i.vac. entfernt. Man erhält 740mg (63%) der Zielverbindung. [DC: Aceto-
15 nitril/Wasser 10:1 $R_f = 0,33$].

V) 20(S)-20-O-(L- Asparaginyl-L-valyl)-camptothecin, Trifluoracetat:

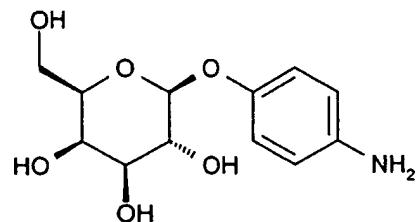
Die tert.-Butoxycarbonyl-Schutzgruppe wird in Analogie zu Beispiel III entfernt.
20 Man erhält 732 mg (97 %) der Zielverbindung [DC: Acetonitril/Wasser/Eisessig
5:1:0,2 $R_f = 0,36$].

Folgende Kohlenhydratbausteine wurden in Analogie zu Beispiel I durch Hydro-
genolyse der entsprechenden z.T. kommerziell erhältlichen p-Nitrophenyl-glycoside
25 gewonnen:

- 30 -

VI) p-Aminophenyl- α -L-rhamnopyranosid5 VII) p-Aminophenyl-3-O-(methoxycarbonyl-methyl)- β -L-fucopyranosid

Die Synthese des entsprechenden p-Nitrophenyl-fucosids ist in Angew. Chem. Int. Ed.
 10 1999, 38, 3681 beschrieben.

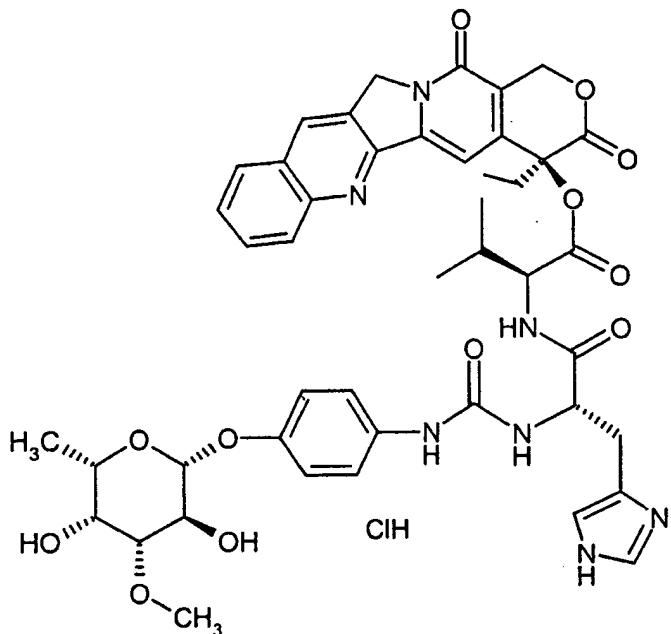
VIII) p-Aminophenyl- β -D-galactopyranosid

15

B) Ausführungsbeispiele

Beispiel 1) 20(S)-20-O-{N^a-[4-(3-O-Methyl- β -L-fucopyranosyloxy)-phenylcarbamoyl]-L-histidyl-L-valyl}-camptothecin, Hydrochlorid

5



1a) 20(S)-20-O-{N^a-[4-(3-O-Methyl- β -L-fucopyranosyloxy)-phenylcarbamoyl]-L-histidyl-L-valyl}-camptothecin:

10

45 mg (0,22 mmol) Chlorameisensäure-p-nitrophenylester und 48 mg Ethyl-diisopropylamin werden in 10 ml Tetrahydrofuran gelöst und anschließend mit 50 mg (0,19 mmol) der Verbindung I, die zuvor in 10 ml Tetrahydrofuran gelöst wurde, versetzt. Nach 5 min Rühren bei Raumtemperatur setzt man 130 mg (0,19 mmol) der Verbindung III und weitere 72 mg (0,56 mmol) Ethyl-diisopropylamin zu und behandelt die Mischung 30 min im Ultraschallbad bei Raumtemperatur. Das Lösungsmittel wird im Vakuum abgedampft und der Rückstand durch Flash-Chromatographie an Kieselgel mit Acetonitril/Wasser 10:1 gereinigt. Die entsprechenden Fraktionen werden eingeengt und der Rückstand aus Dichlormethan/ Methanol mit Diethylether gefällt. Nach Trocknung im Hochvakuum erhält man 52 mg (32,4 %)

20

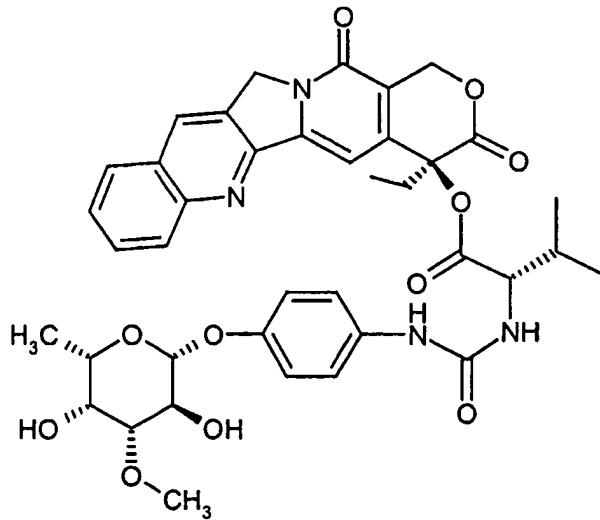
der Zielverbindung. [DC: Acetonitril/Wasser 10:1 $R_f = 0,15$] [FAB-MS: m/z = 880 ($M + H^+$)].

1) 20(S)-20-O-{N^a-[4-(3-O-Methyl- β -L-fucopyranosyloxy)-phenylcarbamoyl]-L-histidyl-L-valyl}-camptothecin, Hydrochlorid

48 mg (0,05 mmol) werden in 10 ml Dioxan/Wasser 1:1 gelöst und mit 545 μ l einer 0,1 N Salzsäurelösung versetzt. Anschließend wird die Lösung lyophilisiert. Der Rückstand wird aus Dichlormethan/Methanol mit Diethylether gefällt. Nach 10 Trocknung im Hochvakuum erhält man 52 mg (32,4%) der Zielverbindung. [DC: Acetonitril/Wasser 10:1 $R_f = 0,15$].

Beispiel 2) 20(S)-20-O-{N^a-[4-(3-O-Methyl- β -L-fucopyranosyloxy)-phenylcarbamoyl]-L-valyl}-camptothecin

15

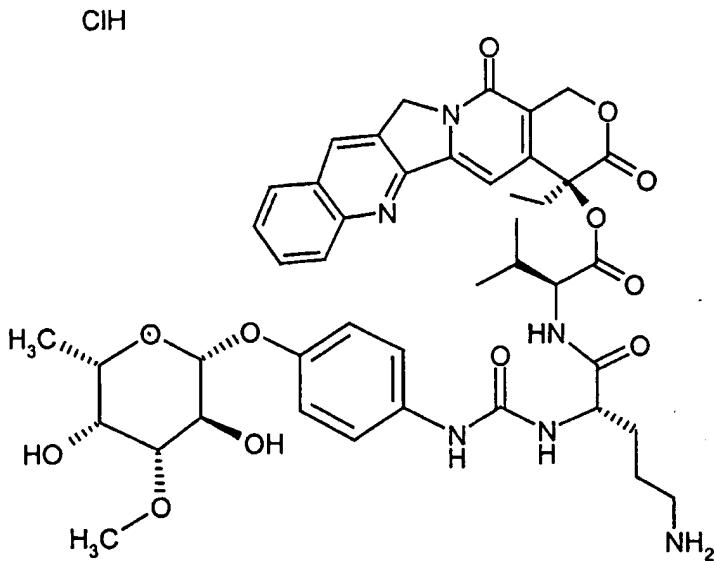


90 mg (0,45 mmol) Chlorameisensäure-p-nitrophenylester und 77 mg Ethyl-diisopropylamin werden in 10 ml Tetrahydrofuran gelöst und anschließend mit 80 mg (0,3 mmol) der Verbindung I, die zuvor in 10 ml Tetrahydrofuran gelöst wurde, versetzt. Nach 5 min Rühren bei Raumtemperatur setzt man 107 mg (0,19 mmol) der Verbindung II und weitere 77 mg (0,59 mmol) Ethyl-diisopropylamin zu und röhrt

über Nacht bei Raumtemperatur. Das Lösungsmittel wird im Vakuum abgedampft und der Rückstand mit Wasser verrührt und anschließend abfiltriert. Daraufhin wird der Rückstand noch zweimal aus Dichlormethan/ Methanol mit Diethylether gefällt. Nach Trocknung im Hochvakuum erhält man 104 mg (70,7%) der Zielverbindung.
 5 [DC: Dichlormethan/Methanol/Ammoniak 17%ig 15:2:0,2 $R_f = 0,48$] [FAB-MS: m/z = (M + H⁺)].

Beispiel 3) 20(S)-20-O-{N^a-[4-(3-O-Methyl- β -L-fucopyranosyloxy)-phenylcarbamoyl]-L-lysyl-L-valyl}-camptothecin, Hydrochlorid

10



3a) 20(S)-20-O-{N^a-[4-(3-O-Methyl- β -L-fucopyranosyloxy)-phenylcarbamoyl]-N^E-[fluorenyl-9-methoxycarbonyl]-}-L-lysyl-L-valyl}-camptothecin:

15

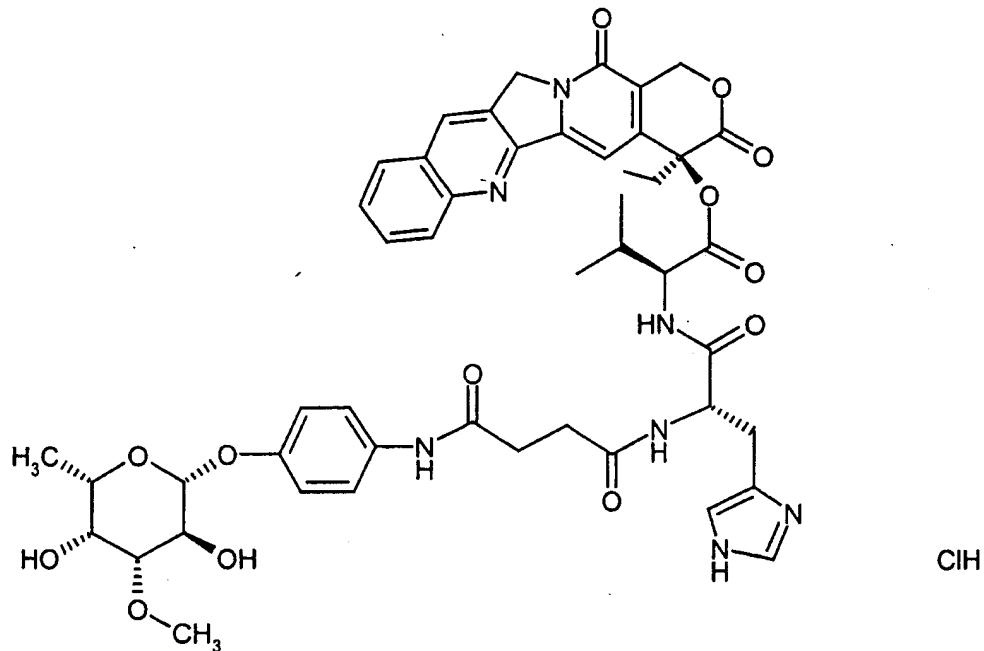
45 mg (0,22 mmol) Chlorameisensäure-p-nitrophenylester und 38 mg Ethyl-diisopropylamin werden in 8 ml Tetrahydrofuran gelöst und anschließend mit 40 mg (0,15 mmol) der Verbindung I, die zuvor in 10 ml Tetrahydrofuran gelöst wurde, versetzt. Nach 5 min Rühren bei Raumtemperatur setzt man 114 mg (0,13 mmol) der Verbindung IV und weitere 48,5 mg (0,56 mmol) Ethyl-diisopropylamin zu und behandelt die Mischung 2h im Ultraschallbad bei Raumtemperatur. Das Lösungsmittel
 20

wird im Vakuum abgedampft und der Rückstand durch Flash-Chromatographie an Kieselgel mit Acetonitril/Wasser/Eisessig 5:1:0,1 gereinigt. Die entsprechenden Fraktionen werden eingeengt und der Rückstand aus Dichlormethan/ Methanol mit Diethylether gefällt. Nach Trocknung im Hochvakuum erhält man 54 mg (40 %) der 5 Zielverbindung. [DC: : Dichlormethan/Methanol/Ammoniak 17%ig 15:2:0,2 R_f = 0,42].

10 3b) 20(S)-20-O-*{N^a-[4-(3-O-Methyl- β -L-fucopyranosyloxy)-phenylcarbamoyl]-L-lysyl-L-valyl}*-camptothecin
50 mg (0,05 mmol) der Verbindung 3a) werden in 5 ml Dimethylformamid gelöst und anschließend mit 500 μ l (0,15 mmol) Piperidin versetzt. Man läßt 30 min bei Raumtemperatur rühren und engt ein. Der Rückstand wird zweimal aus Dichlormethan/Methanol mit Diethylether gefällt. Nach Trocknung im Hochvakuum erhält 15 man 33 mg (83%) der Zielverbindung. [DC: Acetonitril/Wasser/Eisessig 5:1:0,2 R_f = 0,17].

20 3) 20(S)-20-O-*{N^a-[4-(3-O-Methyl- β -L-fucopyranosyloxy)-phenylcarbamoyl]-L-lysyl-L-valyl}*-camptothecin, Hydrochlorid
30 mg (0,04 mmol) werden in 5 ml Dioxan/Wasser 1:1 gelöst und mit 320 μ l einer 0,1 N Salzsäurelösung versetzt. Anschließend wird die Lösung lyophilisiert. Nach Trocknung im Hochvakuum erhält man 31 mg (99 %) der Zielverbindung. [DC: 25 Acetonitril/Wasser 10:1 R_f = 0,15]. [ESI-MS: m/z = 870 = (M + H⁺)].

Beispiel 4) 20(S)-20-O-{N-[3-(4-(3-O-Methyl- β -L-fucopyranosyloxy)-phenylcarbamoyl]-propionyl]-L-histidyl-L-valyl}-camptothecin, Hydrochlorid



5

4a) 3-[4-(3-O-Methyl- β -L-fucopyranosyloxy)-phenylcarbamoyl]-propionsäure

100 mg (0,37mmol) des Edukts I werden in 5 ml Dimethylformamid zusammen mit
 10 52 mg Bernsteinsäureanhydrid und 10 mg Dimethylaminopyridin gelöst und 30 min
 bei Raumtemperatur gerührt. Man engt ein und fällt den Rückstand aus Dichlor-
 methan/Methanol mit Diethylether und trocknet im Hochvakuum. Man erhält 95 mg
 (69 %) der Zielverbindung, die ohne weitere Reinigung in die nächste Stufe einge-
 setzt wird. [DC: Acetonitril/Wasser 10:1 R_f = 0,22].

15

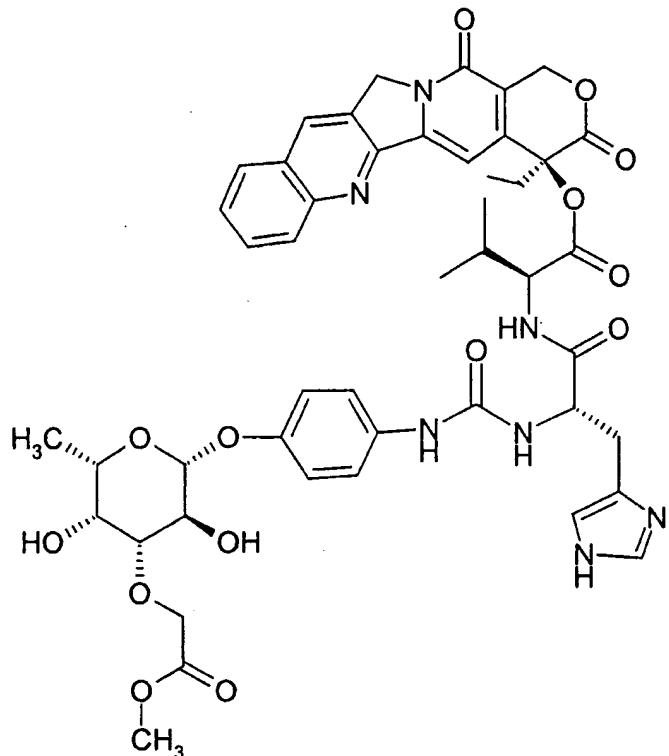
4b) *20(S)-20-O-{N^a-[3-(4-(3-O-Methyl-β-L-fucopyranosyloxy)-phenylcarbamoyl)-propionyl]-L-histidyl-L-valyl}-camptothecin*

50 mg (0,12 mmol) der Verbindung 4a) werden in 15ml DMF gelöst und bei 0°C
5 werden 25 mg (0,18 mmol) 1-Hydroxy-1H-benzotriazol Hydrat und 28 mg
(0,15 mmol) N-Ethyl-N'-(dimethylaminopropyl)-carbodiimid Hydrochlorid hinzuge-
fügt und 30 min gerührt. Anschließend setzt man Verbindung III (100 mg,
10 0,14 mmol) und 48 mg Ethyl-diisopropylamin zu und röhrt den Ansatz für weitere
16 h bei Raumtemperatur. Nach Einengen im Vakuum gibt man Dichlormethan zu
dem Rückstand und röhrt 15 min. Anschließend wird abfiltriert und die organische
Phase eingeengt. Der Rückstand wird durch Flash-Chromatographie an Kieselgel mit
Dichlormethan/Methanol/Ammioniak 17%ig 15:2:0,2 als Eluent gereinigt. Die ent-
sprechenden Fraktionen werden vereinigt, eingeengt und der Rückstand dann aus Di-
chlormethan/Methanol mit Diethylether gefällt. Der Rückstand wird abfiltriert und
15 getrocknet. Man erhält 69 mg (60%) des Zielproduktes. [DC: Dichlor-
methan/Methanol/ Ammoniak 17%ig 15:4:0,5 R_f = 0,5].

4) *20(S)-20-O-{N^a-[3-(4-(3-O-Methyl-β-L-fucopyranosyloxy)-phenylcarbamoyl)-propionyl]-L-histidyl-L-valyl}-camptothecin, Hydrochlorid*

59 mg (0,06 mmol) der Verbindung 4b) werden in 5 ml Dioxan/Wasser 1:1 gelöst
und mit 630 µl einer 0,1 N Salzsäurelösung versetzt. Anschließend wird die Lösung
lyophilisiert. Nach Trocknung im Hochvakuum erhält man 60 mg (98%) der Ziel-
25 verbindung. [DC: Dichlormethan/Methanol/Ammioniak 17%ig 15:4:0,5 R_f = 0,5].

Beispiel 5 20(S)-20-O- $\{\text{N}^{\alpha}\text{-[4-(3-O-(methoxycarbonyl-methyl)- β -L-fucopyranosyloxy)-phenylcarbamoyl]-L-histidyl-L-valyl}\}$ -camptothecin



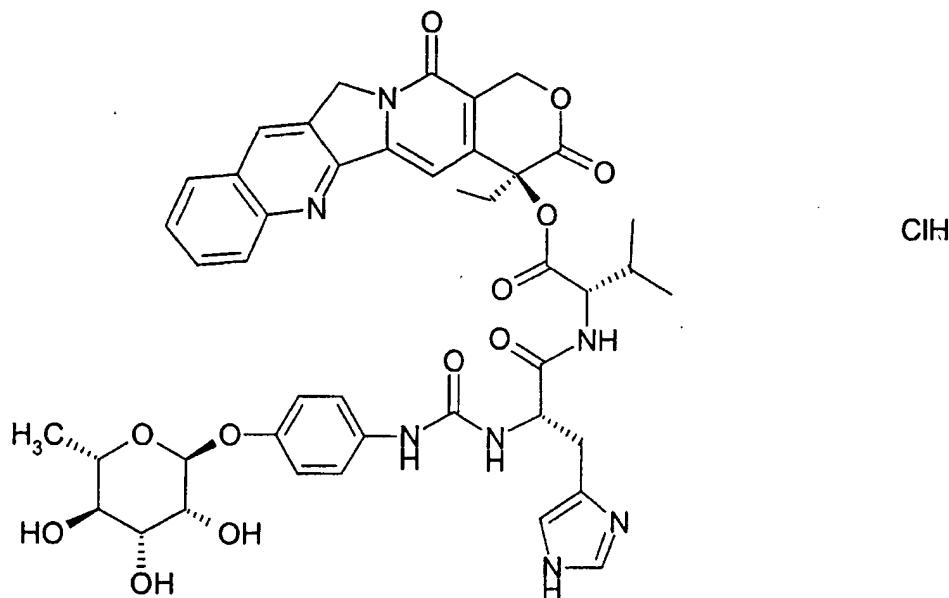
5

Die Darstellung erfolgte in Analogie zu Beispiel 1 ausgehend von den Ausgangsverbindungen III und VII. Die Reinigung erfolgte durch Flash-Chromatographie [Dichlormethan/Methanol/Ammoniak 17%ig 15:1:0,1] auf der Stufe der freien Base.

- 10 Ausbeute: 11% über 2 Stufen. [DC: Acetonitril/Wasser 10:1 $R_f = 0,24$] [ESI-MS: $m/z = 938 (\text{M} + \text{H}^+)$].

15

Beispiel 6 20(S)-20-O-{\N^α-[4-(α-L-rhamnopyranosyloxy)-phenylcarbamoyl]-L-histidyl-L-valyl}-camptothecin, Hydrochlorid



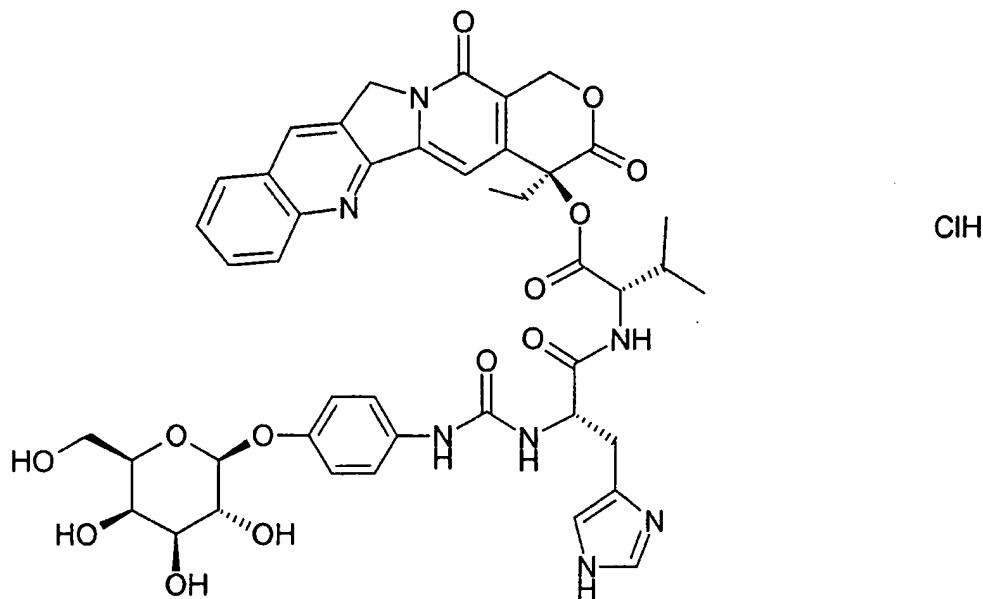
5

Die Darstellung erfolgte in Analogie zu Beispiel 1 ausgehend von den Ausgangsverbindungen II und VI. Die Reinigung erfolgte auf der Stufe der freien Base durch Flash-Chromatographie [Dichlormethan/Methanol/Ammoniak 17%ig 15:2:0,2].

10 Ausbeute: 50% über 3 Stufen. [DC: Acetonitril/Wasser/Eisessig 5:1:0,2 $R_f = 0,32$] [ESI-MS: $m/z = 866 (M + H^+)$].

15

Beispiel 7 20(S)-20-O- {N^α-[4-(β-D-Galactopyranosyloxy)-phenylcarbamoyl]-L-histidyl-L-valyl}-camptothecin, Hydrochlorid



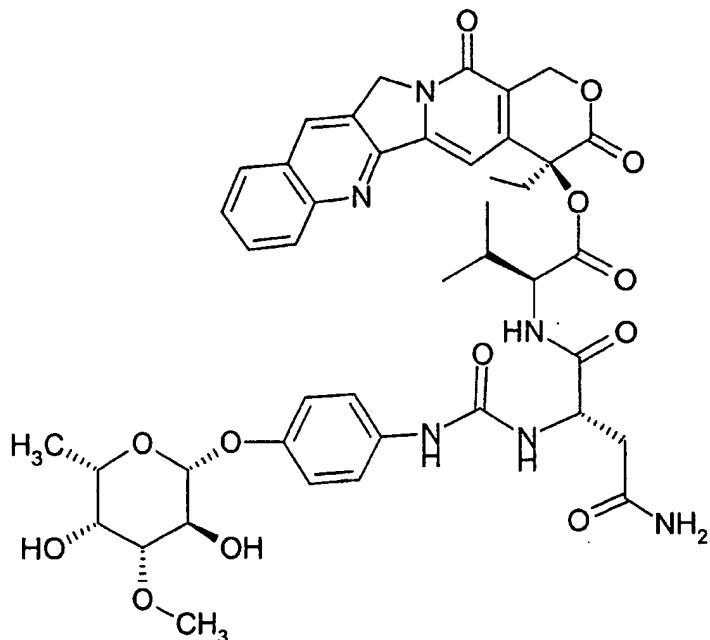
5

Die Darstellung erfolgte in Analogie zu Beispiel 1 ausgehend von den Ausgangsverbindungen II und VIII. Die Reinigung erfolgte auf der Stufe der freien Base durch Flash-Chromatographie [Dichlormethan/Methanol/Ammoniak 17%ig 15:4:0,5-> 15:6:0,6].

10 Ausbeute: 16% über 3 Stufen. [DC: Acetonitril/Wasser/Eisessig 5:1:0,2 R_f = 0,23] [ESI-MS: m/z = 882 (M + H⁺)].

15

Beispiel 8 20(S)-20-O- $\{N^{\alpha}\text{-[4-(3-O-Methyl-}\beta\text{-L-fucopyranosyloxy)-}$
 $\text{phenylcarbamoyl]-L-asparaginyl-L-valyl}\}$ -camptothecin



5

Die Darstellung erfolgte in Analogie zu Beispiel 1 ausgehend von den Ausgangsverbindungen V und I. Die Reinigung erfolgte durch Flash-Chromatographie [Dichlormethan/Methanol/Ammoniak 17%ig 15:1:0,1].

Ausbeute: 58% über 2 Stufen [DC: [Dichlormethan/Methanol/Ammoniak 17%ig 15:3:0,3 R_f = 0,42] [ESI-MS: m/z = 857 (M + H⁺)].

Biologische Tests**1. Wachstumsinhibitionstest zur Bestimmung der cytotoxischen Eigenschaften:**

- 5 Die humanen Dickdarmzelllinien SW 480 und HT 29 (ATCC-Nr. CCL 228 und HBT 38) sowie die Maus-Melanom-Zelllinie B16F10 (CRL 6475) wurden in Rouxschalen in RPMI 1640 Medium unter Zusatz von 10 % FCS gezogen. Anschließend wurde trypsinisiert und in RPMI plus 10 % FCS zu einer Zellzahl von 50.000 Zellen/ml für SW 480 und HT 29 und 20.000 Zellen für B16F10 aufgenommen. 100 µl Zell-
10 suspension/Well wurden in eine 96 Mikrowellplatte gegeben und 1 Tag bei 37°C im CO₂-Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden weitere 100 µl RPMI Medium und 1 µl DMSO mit den Prüfsubstanzen zugesetzt. Das Wachstum wurde nach Tag 6 überprüft. Dazu wurde zu jedem Mikrowell 25 µl MTT-Lösung (3-(4,5-Dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolinbromid) mit einer Ausgangskonzentration von
15 5 mg/ml H₂O zugesetzt. Es wurde 5 Stunden im CO₂-Brutschrank bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und 100 µl i-Propanol/Well zugesetzt. Nach 30 min Schütteln mit 100 µl H₂O wurde die Extinktion bei 595 nm mit einem Multiplate Reader (Bio/Rad) 3550-UV gemessen.
- 20 Die cytotoxische Wirkung ist in der Tabelle 1 als IC₅₀-Wert jeweils für die SW 480- und HT 29- und B16F10-Zelllinie angegeben:

Tabelle 1:

Beispiel	IC ₅₀ / nM SW 480	IC ₅₀ / nM HT 29	IC ₅₀ / nM B16F10
Beispiel 1	170	70	200
Beispiel 2	15	7	30
Beispiel 3	700	400	1000
Beispiel 4	200	100	300
Beispiel 5	50	60	400
Beispiel 6	70	70	400
Beispiel 7	70	80	400
Beispiel 8	400	400	1500
20(S)-Camptothecin	10	6	20

5 2. Hämatopoetische Aktivität des Glycokonjugats im Vergleich zum zugrundeliegenden Wirkstoff:

Material und Methoden:

10 Knochenmarkzellen wurden aus dem Femur der Maus gespült. 10⁵-Zellen wurden in McCoy 5A-Medium (0,3 % Agar) zusammen mit rekombinanten murinen GM-CSF (Genzyme; Stammzellen-Kolonienbildung) und den Substanzen (10⁻⁴ bis 100 µg/ml) bei 37°C und 7 % CO₂ inkubiert. 7 Tage später wurden die Kolonien (<50 Zellen) und Kluster (17-50 Zellen) ausgezählt.

15

Ergebnisse:

Tabelle 2:

Hemmung der CSF-induzierten Proliferation von Knochenmarkstammzellen der Maus

	IC ₅₀ [ng/ml]
Beispiel 1	10
Beispiel 2	0,8
Beispiel 3	100

5

3. HPLC Methode zur Bestimmung der Stabilität im Zellüberstand von HT-29

Ausrüstung: Waters Alliance 2690; UV Detektion bei 257 nM or 356 nM

10 Säule: LiChrospher 100, RP-18 (5µm) 250 x 4mm ; Merck 50833
mit Vorsäule

Bedingungen: Eluent A: 0,01M KH₂PO₄ in H₂O

Eluent B: 80 % Acetonitril + 20 % Eluent A

15

Gradient:	Zeit (min)	Fluß (ml/min)	% A	% B
	0	1	80	20
	10	1	60	40
	15	1	60	40
	20	1	10	90
	30	1	10	90

Methode zur Bestimmung der Stabilität:

HT-29 Tumorzellen (200,000 Zellen/ml) wurden in RPMI 1640 Medium unter Zusatz von 10 % FCS 24h gezogen. Wäßrige Lösungen der Glycokonjugate in Konzentrationen von 10 μ M werden hinzugefügt und 24 Stunden inkubiert. Danach wird der Überstand mit dem gleichen Volumen Methanol verdünnt und anschließend zentrifugiert. 50 μ l der resultierenden Lösung werden in die HPLC injiziert und nach obiger Methode analysiert. Die gemessenen Flächenprozente des Glycokonjugats werden mit denen von freigesetztem Wirkstoff verglichen.

10 Beispielsweise werden bei der Verbindung aus Beispiel 1 nach 24 h 3 % freies Camptothecin detektiert (0% beim Zeitpunkt 0 h), während das Ausgangsglycokonjugat im gleichen Zeitraum von 91,5 auf 87,6 Flächenprozent abgenommen hat.

15 Im Gegensatz dazu wird die Verbindung aus Beispiel 2 im Zellüberstand sehr rasch zu Camptothecin gespalten.

4. In-vivo-Hemmung des Tumorwachstums im Nacktmaus-Modell

Material:

5 Für alle in-vivo-Experimente zur Untersuchung der Hemmung des Tumorwachstums wurden athymische Nacktmäuse (NMRI nu/nu-Stamm) verwendet. Die ausgewählten Tumore wurden durch serielle Passage in Nacktmäusen entwickelt. Der menschliche Ursprung des Tumors wurde durch isoenzymatische und immunohistochemische Methoden belegt.

10

Experimenteller Aufbau:

Der Tumor wurde subcutan in beide Flanken von 6 bis 8 Wochen alten nu/nu-Nacktmäusen implantiert. Die Behandlung wurde abhängig von der Verdopplungszeit gestartet, sobald die Tumoren einen Durchmesser von 5-7 mm erreicht hatten. Die Mäuse wurden der Behandlungsgruppe und der Kontrollgruppe (5 Mäuse pro Gruppe mit 8 - 10 auswertbaren Tumoren) durch Randomisieren zugeteilt. Die einzelnen Tumoren der Kontrollgruppe wuchsen alle progressiv.

15

Die Größe der Tumoren wurde in zwei Dimensionen mittels Schieblehre vermessen. Das Tumorvolumen, das gut mit der Zellzahl korreliert, wurde anschließend für alle Auswertungen verwendet. Das Volumen wurde gemäß der Formel "Länge x Breite x Breite / 2" berechnet ($[a \times b^2] / 2$, a bzw. b stehen für zwei rechtwinklig angeordnete Durchmesser).

20

Die Werte des relativen Tumorvolumens (RTV) wurden für jeden einzelnen Tumor durch Dividieren der Tumogröße am Tag X mit der Tumogröße des Tages 0 (zum Zeitpunkt der Randomisierung) berechnet. Die mittleren Werte des RTV wurden dann für die weitere Auswertung verwendet.

25

30

- 46 -

Die Hemmung des Tumorvolumens (relatives Tumorvolumen der Testgruppe/Kontrollgruppe x 100, T/C in %) war der abschließende Meßwert.

5 *Behandlung:*

Die Applikation der Verbindungen erfolgte intravenös (i.v.), intraperitoneal (i.p.), oral (p.o.) oder subcutan (s.c.).

10 Die Verbindung aus Beispiel 1 wurde *in vivo* im Nacktmausmodell am subcutan wachsenden Melanomtumor MEXF 989 bei sechsmaliger intravenöser Gabe an Tag 1-3 und 15-17 untersucht. Mit einer Dosis von 16 mg/kg/Tag wurde eine signifikante Hemmung des Tumorwachstums mit einem optimalen T/C-Wert von 22.5 % erzielt, wobei keine Toxizität beobachtet wurde.

15

Patentansprüche

1. Verbindungen der allgemeinen Formel (I)

5

K - Sp - L - AA1 - AA2 - C (I)

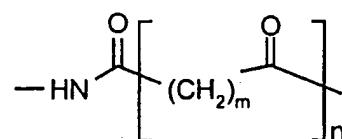
mit

K = unsubstituierter oder regioselektiv modifizierter Kohlenhydratrest

10

Sp = gegebenenfalls substituiertes Arylen oder Alkylen

L =



15

wobei

m eine ganze Zahl von 1 bis 6 bedeutet

n 0 oder 1 bedeutet

20

wobei die Verknüpfung zu Sp über die NH-Gruppe erfolgt.

25

AA1 eine direkte Bindung oder ein Aminosäure-Rest in der D- oder L-Konfiguration, der gegebenenfalls Schutzgruppen oder eine zweite Gruppierung K-Sp-L- trägt, in der K, Sp, L unabhängig von der anderen Gruppierung K-Sp-L- die oben angegebenen Bedeutungen haben können.

AA2 eine direkte Bindung oder ein Aminosäure-Rest in der D- oder L-Konfiguration, der gegebenenfalls Schutzgruppen oder eine zweite Gruppierung K-Sp-L- trägt, in der K, Sp, L unabhängig von der anderen Gruppierung K-Sp-L- die oben angegebenen Bedeutungen haben können.

5

C ein cytotoxischer Rest oder der Rest eines Cytostatikums oder Cytostatikumderivats ist, der zusätzlich eine Hydroxy- oder Aminogruppe tragen kann und über eine Ester- oder Amidgruppe an AA2 gebunden ist,

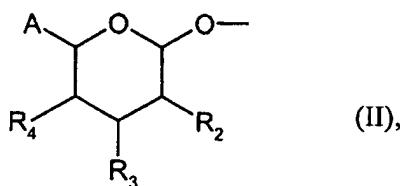
10

und deren Isomere und Salze.

2. Verbindungen nach Anspruch 1, worin

15

K Kohlenhydratrest mit der allgemeinen Formel (II)



wobei

20

A Methyl, Hydroxymethyl, Carboxy sowie davon abgeleitete Ester und Amide, Alkoxyethyl, Acyloxyethyl oder Carboxyalkyloxyethyl sowie davon abgeleitete Ester und Amide oder $\text{CH}_2\text{-B}$ bedeutet,

25

wobei

B wiederum ein über das anomere Zentrum verknüpfter Kohlenhydratrest der allgemeinen Formel (II) ist,

5

R_2 , R_3 , R_4 einzeln oder zusammen gleich H, Hydroxy, Alkyloxy, Carboxyalkyloxy sowie davon abgeleitete Ester und Amide, Hydroxyalkyloxy, Aminoalkyloxy, Acyloxy, Carboxyalkylcarbonyloxy, Sulfato, Phosphato, Halogen, oder ein weiterer modifizierter und über das anomere Zentrum verknüpfter Kohlenhydratrest (II) bedeutet, wobei R_2 zusätzlich auch Amino oder Acylamino sein kann und/oder zwei der Reste R_2 , R_3 , R_4 auch zusammen eine Epoxygruppe bilden können,

10

und Sp, L, m, n, AA1, AA2 und C die gleiche Bedeutung wie in Anspruch 1 definiert haben.

3. Verbindungen nach Anspruch 1, worin

15

Sp Arylen, das ortho-, meta- oder para-ständig mit K und L modifiziert ist und darüber hinaus noch 1 bis 4 weitere Substituenten tragen kann, die unabhängig oder gleich H, Methyl, Methoxy, Hydroxy, Carboxy, Methyloxycarbonyl, Cyano, Nitro, Halogen, Sulfonyl oder Sulfonamid sein können, oder ein linearer oder verzweigter Alkylen-Rest ist,

20

und K, L, m, n, AA1, AA2 und C die gleiche Bedeutung wie in Anspruch 1 definiert haben.

25

4. Verbindungen nach Anspruch 1, worin

30

C ein Nucleosid, ein Endiin-Antibiotikum oder ein cytotoxisches Peptidantibiotikum, eine Chinolon- oder Naphthyridoncarbonsäure oder Batracylin, 5-Fluorouracil, Cytosinarabinosid, Methotrexat, Etoposid, Camptothecin, Daunomycin, Doxorubicin, Taxol, Vinblastin, Vincristin, Dynemicin, Calicheamycin, Esperamycin, Quercetin,

Suramin, Erbstatin, Cyclophosphamid, Mitomycin C, Melphalan, Cisplatin, Bleomycin, Staurosporin oder ein anderer antineoplastisch aktiver Wirkstoff sein kann, der zusätzlich eine Hydroxy- oder Aminogruppe tragen kann und über eine Ester- oder Amidgruppe an 5 AA2 gebunden ist,

und K, Sp L, m, n, AA1 und AA2 die gleiche Bedeutung wie in Anspruch 1 definiert haben.

10 5. Verbindungen nach Anspruch 4, worin

C für Camptothecin steht.

6. Verbindungen nach Anspruch 1, worin

15 n gleich 0 ist

und K, Sp L, m, AA1, AA2 und C die gleiche Bedeutung wie in Anspruch 1 definiert haben.

20 7. Verbindungen nach Anspruch 1, worin

n gleich 0 ist

25 AA1 eine Direktbindung ist

und K, Sp, m, AA2 und C wie in Anspruch 1 definiert sind.

30 8. Verfahren zur Herstellung von Verbindungen der Formel (I) gemäß Anspruch 1, umfassend die Umsetzung einer Verbindung der Formel

K-Sp-NH₂

wobei

5

K und Sp die in Anspruch 1 definierte Bedeutung haben,

mit

- 10 a) einem Chlorameisensäureester in Gegenwart einer Base in einem organischen Lösungsmittel

oder

- 15 b) einer Alkandicarbonsäure oder einem Dicarboxylderivat davon in Gegenwart einer Base in einem organischen Lösungsmittel

und die anschließende Umsetzung mit einer Verbindung der Formel

20

AA1-AA2-C

wobei AA1, AA2 und C die in Anspruch 1 definierte Bedeutung haben, in Gegenwart einer Base in einem organischen Lösungsmittel.

25 9. Arzneimittel, enthaltend eine Verbindung der Formel (I) gemäß Anspruch 1.

10. Verwendung von Verbindungen der Formel (I) gemäß Anspruch 1 zur Herstellung von Arzneimitteln zur Bekämpfung von Krebserkrankungen.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 01/00793

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C07K9/00 C07H15/203 A61K31/70 C07D491/22 A61K38/14

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C07K C07H A61K C07D

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 501 250 A (BAYER AG) 2 September 1992 (1992-09-02) cited in the application the whole document ---	1-10
X	WO 98 14459 A (VON DEM BRUCH KARSTEN ;BAYER AG (DE); SPERZEL MICHAEL (DE); BAUMGA) 9 April 1998 (1998-04-09) cited in the application the whole document page 10, line 8 -page 10, line 13 page 5, line 14 -page 5, line 18 ---	1-10
X	WO 96 31532 A (BAYER AG ;LERCHEN HANS GEORG (DE); VON DEM BRUCH KARSTEN (DE); PET) 10 October 1996 (1996-10-10) cited in the application the whole document ---	1-10
	-/-	

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

8 June 2001

Date of mailing of the international search report

29/06/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Gohlke, P

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 01/00793

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98 51703 A (VON DEM BRUCH KARSTEN ;BAYER AG (DE); SPERZEL MICHAEL (DE); BAUMGA) 19 November 1998 (1998-11-19) cited in the application page 2, line 8 -page 2, line 31 claims ---	1-10
A	US 5 807 559 A (JONDAL MIKAEL) 15 September 1998 (1998-09-15) column 9, line 46 -column 9, line 67 column 11, line 29 -column 11, line 32 ---	1-10
A	US 5 858 994 A (KRETZSCHMAR GERHARD ET AL) 12 January 1999 (1999-01-12) column 11, line 42 -column 11, line 46 -----	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int'l. Application No

PCT/EP 01/00793

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
EP 0501250	A 02-09-1992	DE 4106101 A CA 2060746 A CA 2061993 A FI 920834 A HU 60283 A JP 5078394 A		03-09-1992 27-08-1992 28-08-1992 28-08-1992 28-08-1992 30-03-1993
WO 9814459	A 09-04-1998	DE 19643764 A AU 4459297 A EP 0934329 A		02-04-1998 24-04-1998 11-08-1999
WO 9631532	A 10-10-1996	DE 19512484 A AT 186738 T AU 713466 B AU 5397696 A BG 63048 B BG 101892 A BR 9604825 A CA 2217164 A CN 1185786 A CZ 9703143 A DE 59603678 D DK 819135 T EP 0819135 A ES 2140078 T GR 3032605 T HU 9800513 A JP 11502860 T NO 974564 A PL 322681 A SI 819135 T SK 134597 A TW 384290 B		17-10-1996 15-12-1999 02-12-1999 23-10-1996 28-02-2001 29-05-1998 05-01-1999 10-10-1996 24-06-1998 14-01-1998 23-12-1999 08-05-2000 21-01-1998 16-02-2000 31-05-2000 29-06-1998 09-03-1999 25-11-1997 16-02-1998 30-04-2000 06-05-1998 11-03-2000
WO 9851703	A 19-11-1998	DE 19801037 A DE 19813137 A AU 7761598 A BG 103872 A BR 9809637 A CN 1255926 T EP 0981542 A NO 995481 A PL 336697 A SK 154899 A TR 9902775 T ZA 9804025 A		19-11-1998 30-09-1999 08-12-1998 31-07-2000 11-07-2000 07-06-2000 01-03-2000 09-11-1999 03-07-2000 14-08-2000 21-07-2000 13-11-1998
US 5807559	A 15-09-1998	AT 197903 T AU 676679 B AU 4274693 A CA 2134097 A CN 1096032 A DE 69329735 D DK 675733 T EP 0675733 A ES 2155070 T IL 105503 A JP 7506358 T		15-12-2000 20-03-1997 29-11-1993 11-11-1993 07-12-1994 11-01-2001 07-05-2001 11-10-1995 01-05-2001 09-05-1999 13-07-1995

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 01/00793

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
US 5807559	A	WO	9321948 A	11-11-1993
		SI	9300223 A	31-03-1994
		US	6033669 A	07-03-2000
		ZA	9302852 A	31-01-1994
US 5858994	A	12-01-1999	DE	4436164 A
			CA	2160100 A
			EP	0714903 A
			JP	8325286 A
				11-04-1996
				11-04-1996
				05-06-1996
				10-12-1996

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/00793

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C07K9/00 C07H15/203 A61K31/70 C07D491/22 A61K38/14

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchiertes Mindestprässtoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C07K C07H A61K C07D

Recherchierte aber nicht zum Mindestprässtoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data, BIOSIS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP 0 501 250 A (BAYER AG) 2. September 1992 (1992-09-02) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ---	1-10
X	WO 98 14459 A (VON DEM BRUCH KARSTEN ;BAYER AG (DE); SPERZEL MICHAEL (DE); BAUMGA) 9. April 1998 (1998-04-09) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument Seite 10, Zeile 8 -Seite 10, Zeile 13 Seite 5, Zeile 14 -Seite 5, Zeile 18 ---	1-10
X	WO 96 31532 A (BAYER AG ;LERCHEN HANS GEORG (DE); VON DEM BRUCH KARSTEN (DE); PET) 10. Oktober 1996 (1996-10-10) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ---	1-10
		-/-

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweitliehft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
- *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- *&* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

8. Juni 2001

Absendedatum des Internationalen Recherchenberichts

29/06/2001

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Gohlke, P

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/00793

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 98 51703 A (VON DEM BRUCH KARSTEN ;BAYER AG (DE); SPERZEL MICHAEL (DE); BAUMGA) 19. November 1998 (1998-11-19) in der Anmeldung erwähnt Seite 2, Zeile 8 -Seite 2, Zeile 31 Ansprüche ---	1-10
A	US 5 807 559 A (JONDAL MIKAEL) 15. September 1998 (1998-09-15) Spalte 9, Zeile 46 -Spalte 9, Zeile 67 Spalte 11, Zeile 29 -Spalte 11, Zeile 32 ---	1-10
A	US 5 858 994 A (KRETZSCHMAR GERHARD ET AL) 12. Januar 1999 (1999-01-12) Spalte 11, Zeile 42 -Spalte 11, Zeile 46 -----	1-10

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/00793

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
EP 0501250 A	02-09-1992	DE 4106101 A		03-09-1992
		CA 2060746 A		27-08-1992
		CA 2061993 A		28-08-1992
		FI 920834 A		28-08-1992
		HU 60283 A		28-08-1992
		JP 5078394 A		30-03-1993
WO 9814459 A	09-04-1998	DE 19643764 A		02-04-1998
		AU 4459297 A		24-04-1998
		EP 0934329 A		11-08-1999
WO 9631532 A	10-10-1996	DE 19512484 A		17-10-1996
		AT 186738 T		15-12-1999
		AU 713466 B		02-12-1999
		AU 5397696 A		23-10-1996
		BG 63048 B		28-02-2001
		BG 101892 A		29-05-1998
		BR 9604825 A		05-01-1999
		CA 2217164 A		10-10-1996
		CN 1185786 A		24-06-1998
		CZ 9703143 A		14-01-1998
		DE 59603678 D		23-12-1999
		DK 819135 T		08-05-2000
		EP 0819135 A		21-01-1998
		ES 2140078 T		16-02-2000
		GR 3032605 T		31-05-2000
		HU 9800513 A		29-06-1998
		JP 11502860 T		09-03-1999
		NO 974564 A		25-11-1997
		PL 322681 A		16-02-1998
		SI 819135 T		30-04-2000
		SK 134597 A		06-05-1998
		TW 384290 B		11-03-2000
WO 9851703 A	19-11-1998	DE 19801037 A		19-11-1998
		DE 19813137 A		30-09-1999
		AU 7761598 A		08-12-1998
		BG 103872 A		31-07-2000
		BR 9809637 A		11-07-2000
		CN 1255926 T		07-06-2000
		EP 0981542 A		01-03-2000
		NO 995481 A		09-11-1999
		PL 336697 A		03-07-2000
		SK 154899 A		14-08-2000
		TR 9902775 T		21-07-2000
		ZA 9804025 A		13-11-1998
US 5807559 A	15-09-1998	AT 197903 T		15-12-2000
		AU 676679 B		20-03-1997
		AU 4274693 A		29-11-1993
		CA 2134097 A		11-11-1993
		CN 1096032 A		07-12-1994
		DE 69329735 D		11-01-2001
		DK 675733 T		07-05-2001
		EP 0675733 A		11-10-1995
		ES 2155070 T		01-05-2001
		IL 105503 A		09-05-1999
		JP 7506358 T		13-07-1995

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/00793

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
US 5807559	A	WO	9321948 A	11-11-1993
		SI	9300223 A	31-03-1994
		US	6033669 A	07-03-2000
		ZA	9302852 A	31-01-1994
US 5858994	A	12-01-1999	DE	4436164 A
			CA	2160100 A
			EP	0714903 A
			JP	8325286 A
				11-04-1996
				11-04-1996
				05-06-1996
				10-12-1996